

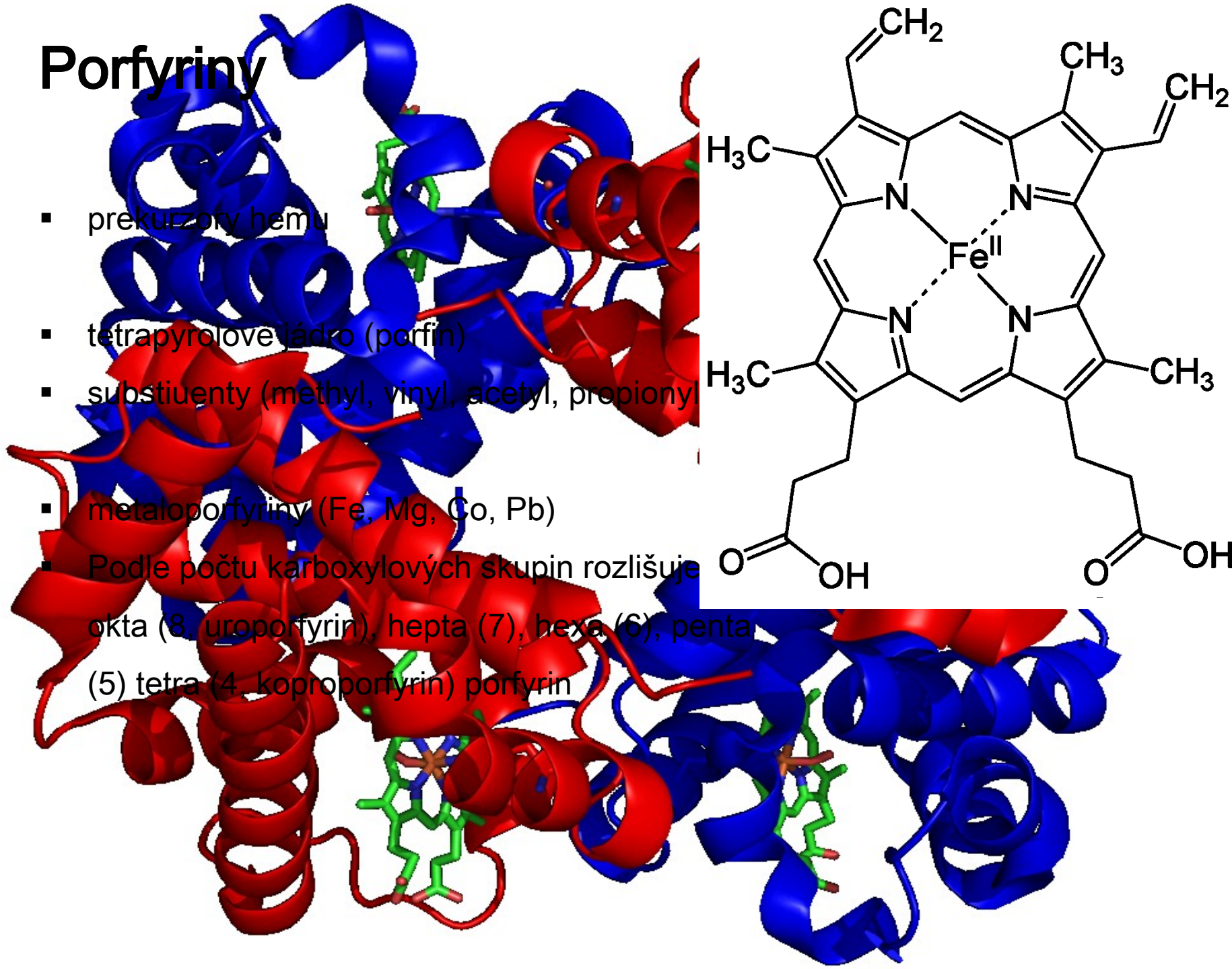
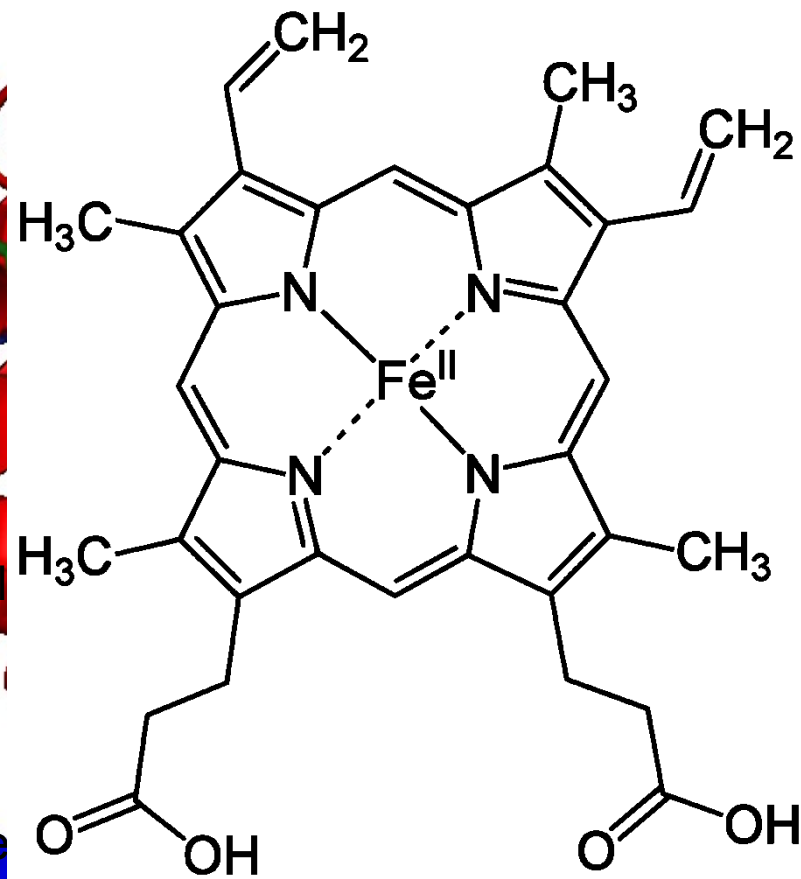
# Krevní barviva

Jana Tomanová

Upraveno dle prezentace Veroniky Pleškové

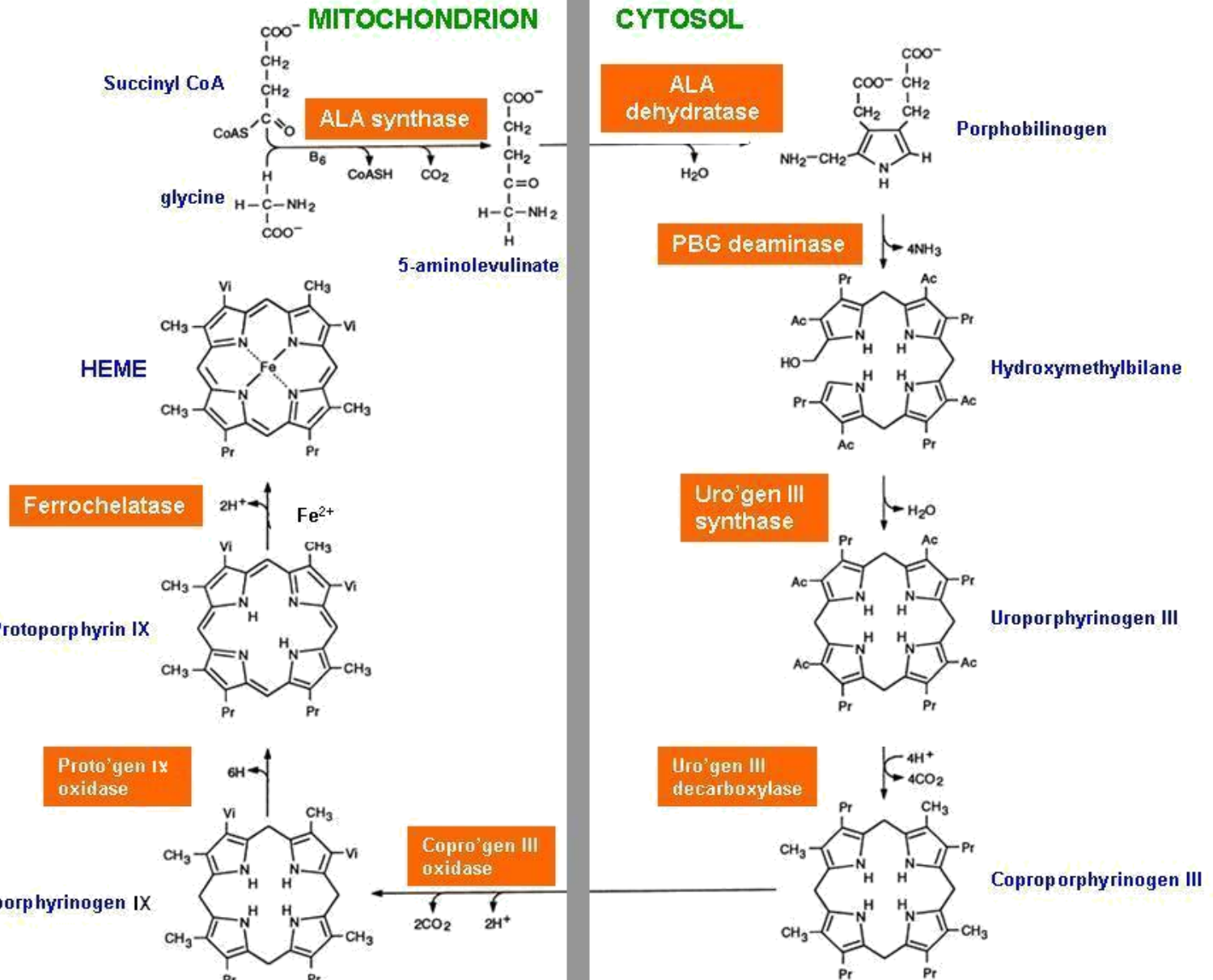
# Porfyriny

- prekurzory hemu
- tetrapyrrolové jádro (porfín)
- substituenty (methyl, vinyl, acetyl, propionyl)
- metaloporfyriny (Fe, Mg, Co, Pb)
- Podle počtu karboxylových skupin rozlišuje se okta (8, uroporfyrin), hepta (7), hexa (6), penta (5) tetra (4, koproporfyrin) porfyrin





# Porfyrin – biosyntéza



# Poruchy metabolismu porfyrinů - Porfyrie

- Dědičná, metabolická porucha
- porucha funkce kteréhokoliv enzymu syntézy porfyrinů za stupněm ALA a následně hromadění daných metabolitů v některých tkáních  
⇒ ↑ hladina v plasmě a erythrocytech, ↑ vylučování stolicí a močí.
- **Klinické projevy porfyrií**
  - neurologické* - křeče a svalové slabosti, které mohou vést k částečné obrně (paréze) až ochrnutí (plegie), zejména rukou
  - kožní* - vysoká zranitelnost kůže, spontánní tvorba puchýřků, hyperpigmentace a ochlupení v obličeji
  - abdominální* - nevolnost, zvracení, zácpa, kolika
  - psychické* - zmatenost, deprese, úzkost, zapomínání, halucinace
  - ostatní* - anémie, červené zbarvení zubů (Günther), zvětšení sleziny, červené zbarvení moče, které stáhním tmavne



# Poruchy metabolismu porfyrinů - Porfyrie

- **Klinické projevy porfyrií**

Pozdní kožní porfyrie (PCT) – vysoká zranitelnost kůže, spontánní tvorba puchýřům hyperpigmentace

- klinická manifestace často iniciována současným jaterním postižením (nadměrná konzumace alkoholu, hepatitida C, vzácně estrogeny)

- nelečená může vést ke vzniku karcinomu jater

Akutní ataky (AIP) – křečovitě až agonizující bolesti břicha

- další příznaky: např. tachykardie, zvracení, křeče

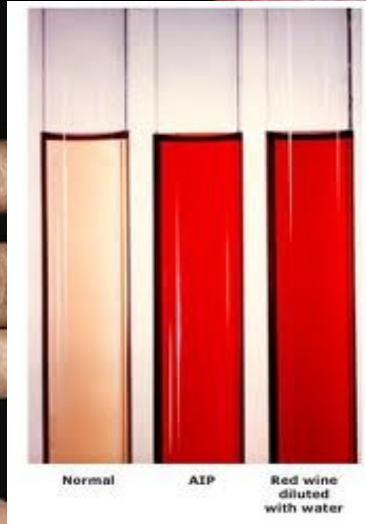
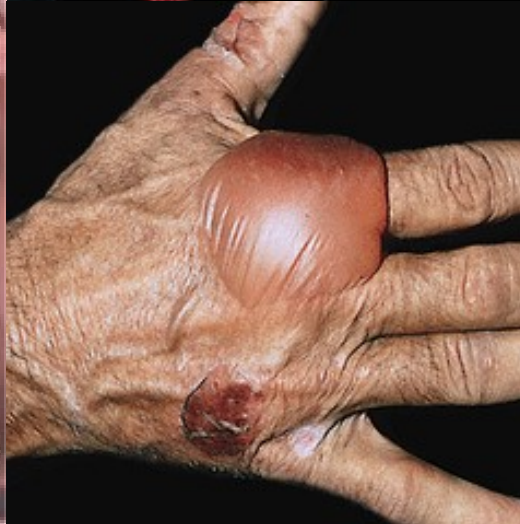
*Pozn!* Důležitá prevence – akutní ataka často vyvolána použitím léků, kt. nemocní nesmějí dostat

- nutné, aby co nejširší okruh členů rodiny věděl, zda porfyrii trpí či nikoli

- pokud je ale jedinec nositel genu, ale neprodělal klinicky záchvat, je dg. na základě fluorescenčních a fotometrických metod obtížná

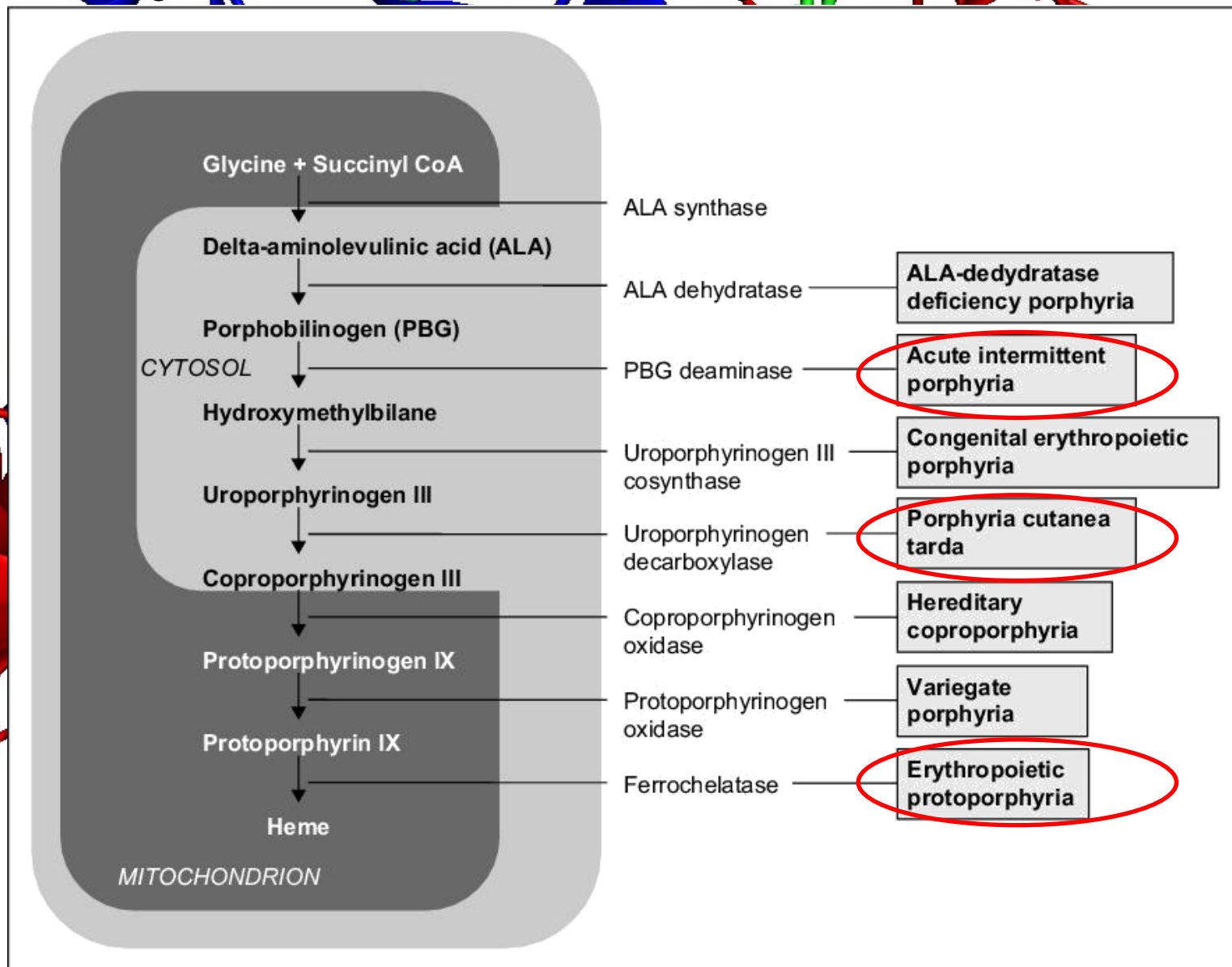
-> zjišťování genové mutace

# Porfyrie





# Poruchy metabolismu porfyriňu

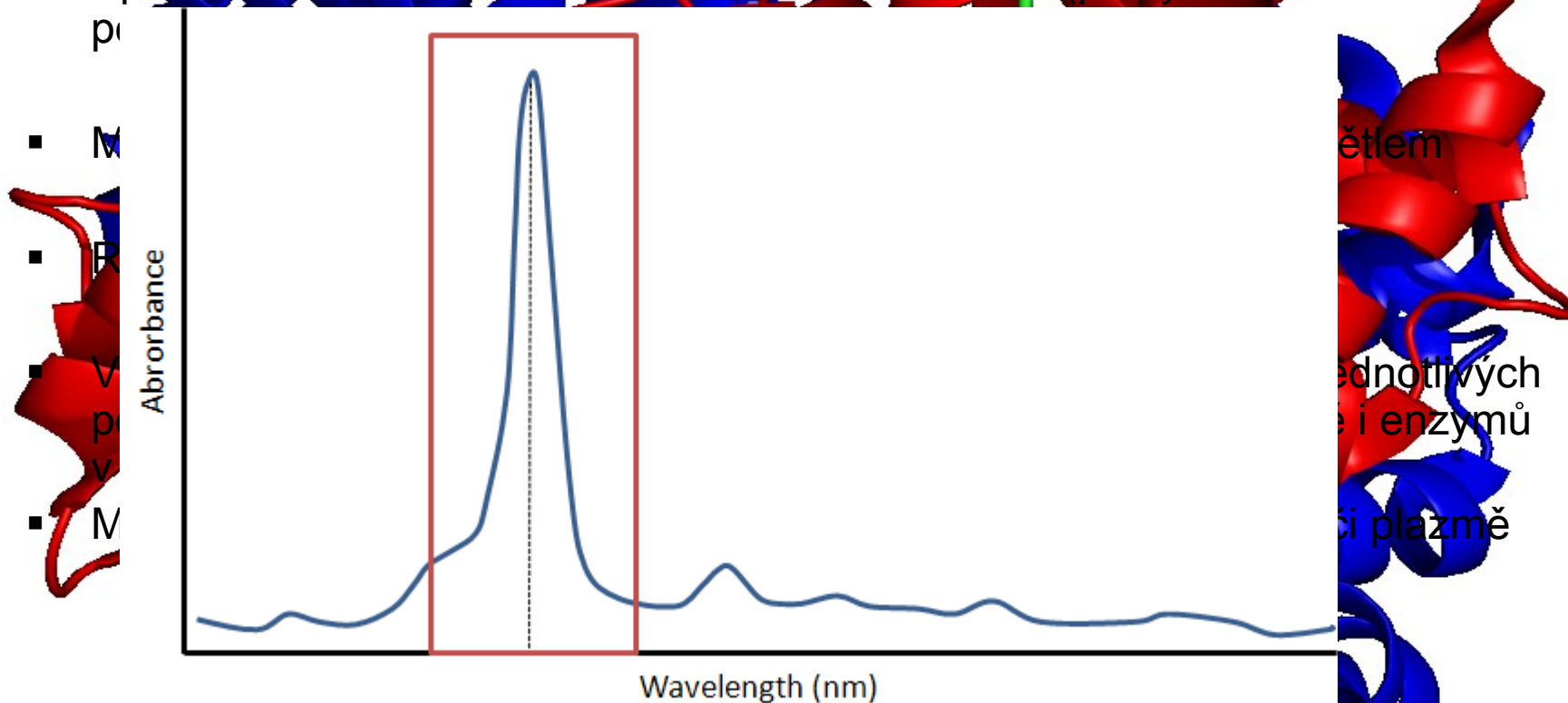


Typ porfyrie	Enzym	Hlavní příznaky	moč	stolice	Laboratorní nálezy	krvinky
<i>Z deficitu ALA dehydratasy</i>	ALA dehydratasa	Abdominální bolest, neuropsychické potíže	↑ALA, ↑KOPRO	-		↑PROTO
<i>Akutní intermitentní (hepatální)</i>	Porfobilinogen deaminasa	abdominální bolest, zácpa, zvracení, hypertenze a psychické problémy (hysterie), bolesti hlavy	↑ALA, ↑PGB, ↑URO	-		-
<i>Kongenitální erythropoetická</i>	Uroporfyrinogen III kosynthetasa	fotosenzitivita	↑URO, ↑KOPRO	↑KOPRO		↑URO, ↑KOPRO
<i>Porphyria cutanea tarda (hepatální)</i>	Uroporfyrinogen dekarboxylasa	fotosenzitivita	↑URO, ↑HEPTA	↑KOPRO		-
<i>Hereditární koproporfyrurie (hepatální)</i>	Koproporfyrinogen oxidasa	fotosenzitivita, abdominální bolest, neuropsychické potíže	↑ALA, ↑PGB, ↑KOPRO	↑KOPRO		-
<i>Porphyria variegata (hepatální)</i>	Protoporfyrinogen oxidasa	fotosenzitivita, abdominální bolest, neuropsychické potíže	↑ALA, ↑PGB, ↑KOPRO	↑PROTO, ↑KOPRO		-
<i>Protoporphyria (erytrohepatální)</i>	ferrochelataasa	fotosenzitivita	-	↑PROTO		↑PROTO



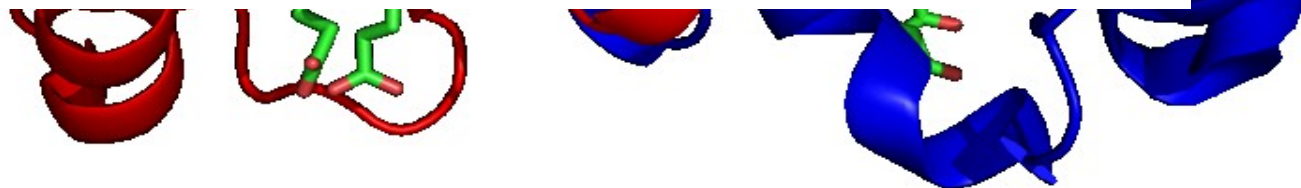
# Stanovení celkových porfyrinů

- Charakteristické absorpční spektrum – Soretův pás, s maximem okolo 400 nm
- Spektrofotometrická křivka v oblasti 350 – 450 nm (při vyšším obsahu URO po



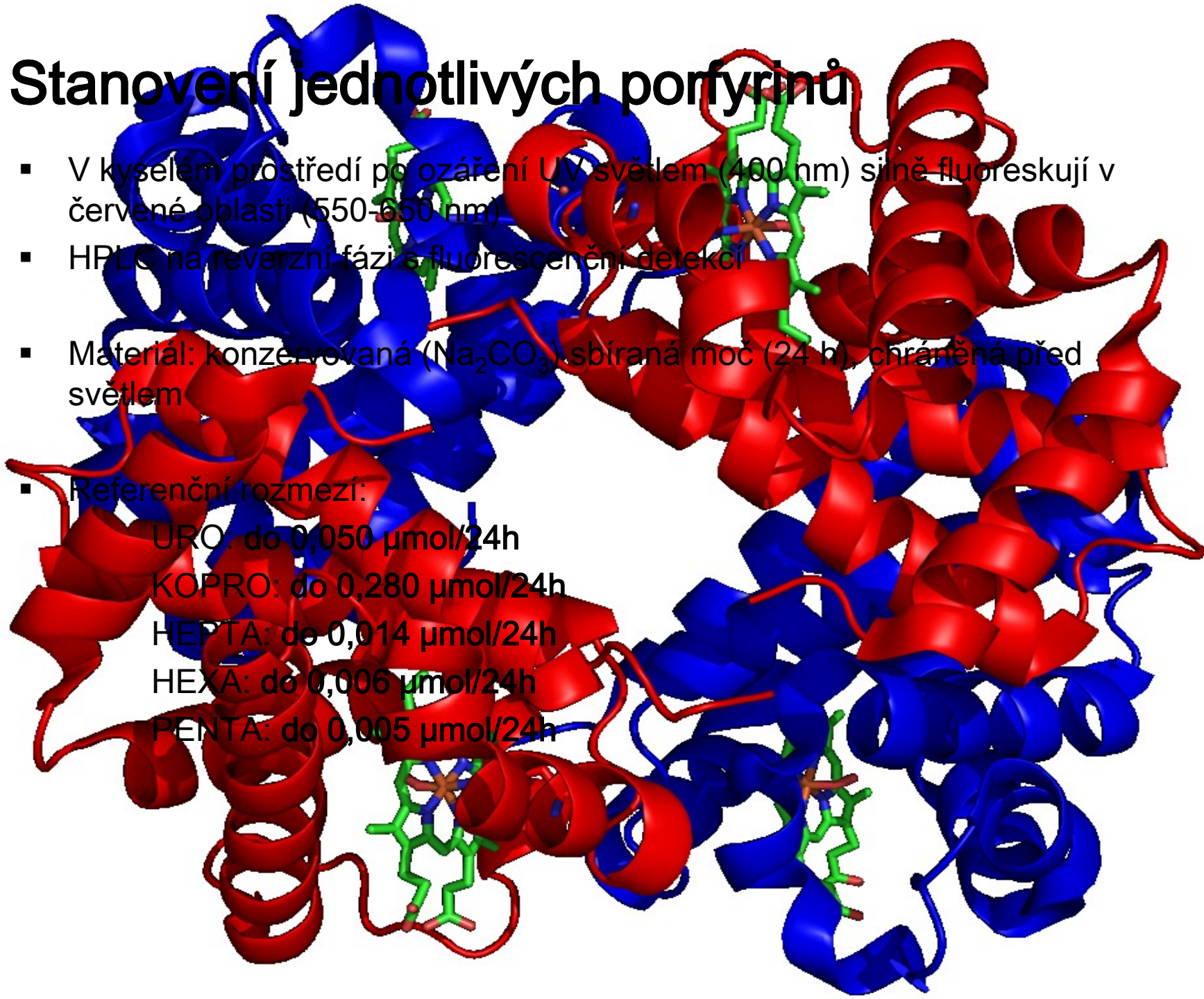
- M
- R
- V
- p
- v
- M

ětlem  
ednotlivých  
e i enzymů  
ci plazmě



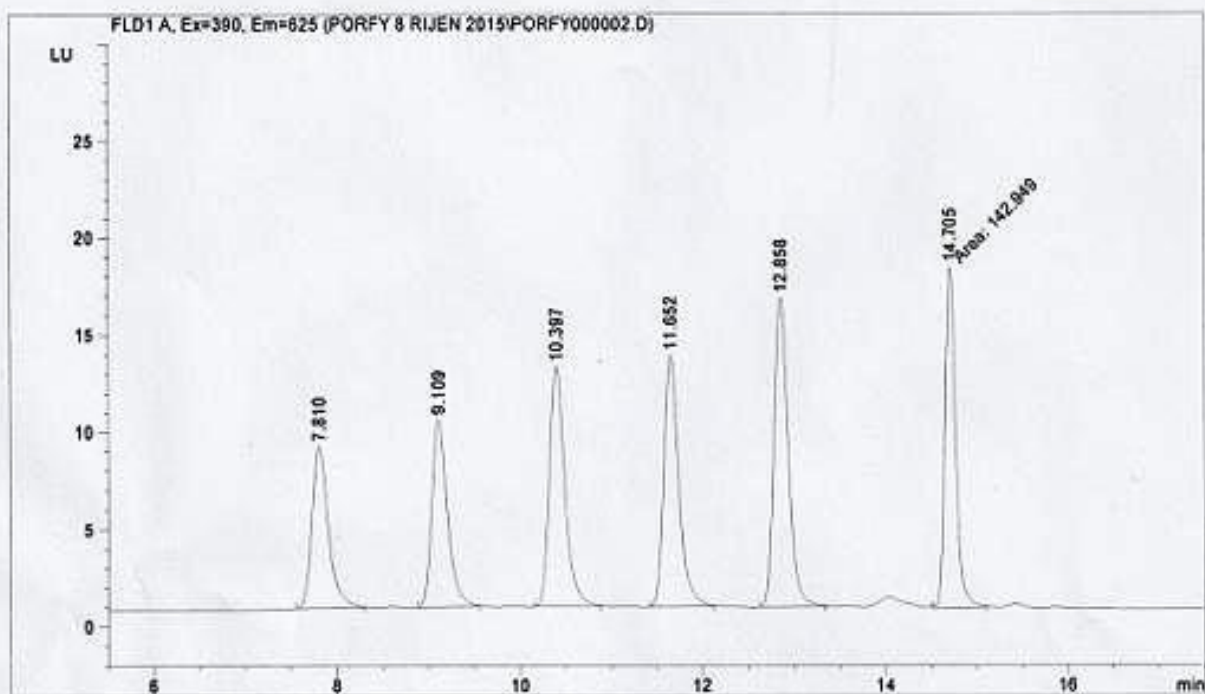
# Stanovení jednotlivých porfyrinů

- V kyselém prostředí po ozáření UV světlem (400 nm) silně fluoreskují v červené oblasti (550-650 nm)
- HPLC na reverzní fázi s fluorescenční detekcí
- Materiál: konzervovaná ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) sbíraná moč (24 h), chráněná před světlem
- Referenční rozmezí:
  - URO: do 0,050  $\mu\text{mol}/24\text{h}$
  - KOPRO: do 0,280  $\mu\text{mol}/24\text{h}$
  - HEPTA: do 0,014  $\mu\text{mol}/24\text{h}$
  - HEXA: do 0,006  $\mu\text{mol}/24\text{h}$
  - PENTA: do 0,005  $\mu\text{mol}/24\text{h}$





# Stanovení jednotlivých porfyrinů



## External Standard Report

Sorted By : Signal  
Calib. Data Modified : 8.10.2015 10:34:37  
Multiplier : 1.0000  
Dilution : 1.0000  
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FLD1 A, Ex=390, Em=625

RetTime [min]	Type	Area LU	Amt/Area $\mu\text{g}$	Amount [umol/l]	Grp	Name
7.810	BB	102.80725	1.94539e-3	2.00000e-1		URO
9.109	BB	113.63637	1.76000e-3	2.00000e-1		HEPTA
10.397	BB	145.63976	1.37325e-3	2.00000e-1		HEXA
11.652	BB	147.33250	1.35747e-3	2.00000e-1		PENTA
12.858	BB	172.64391	1.15845e-3	2.00000e-1		KOPRO

Totals : 1.00000

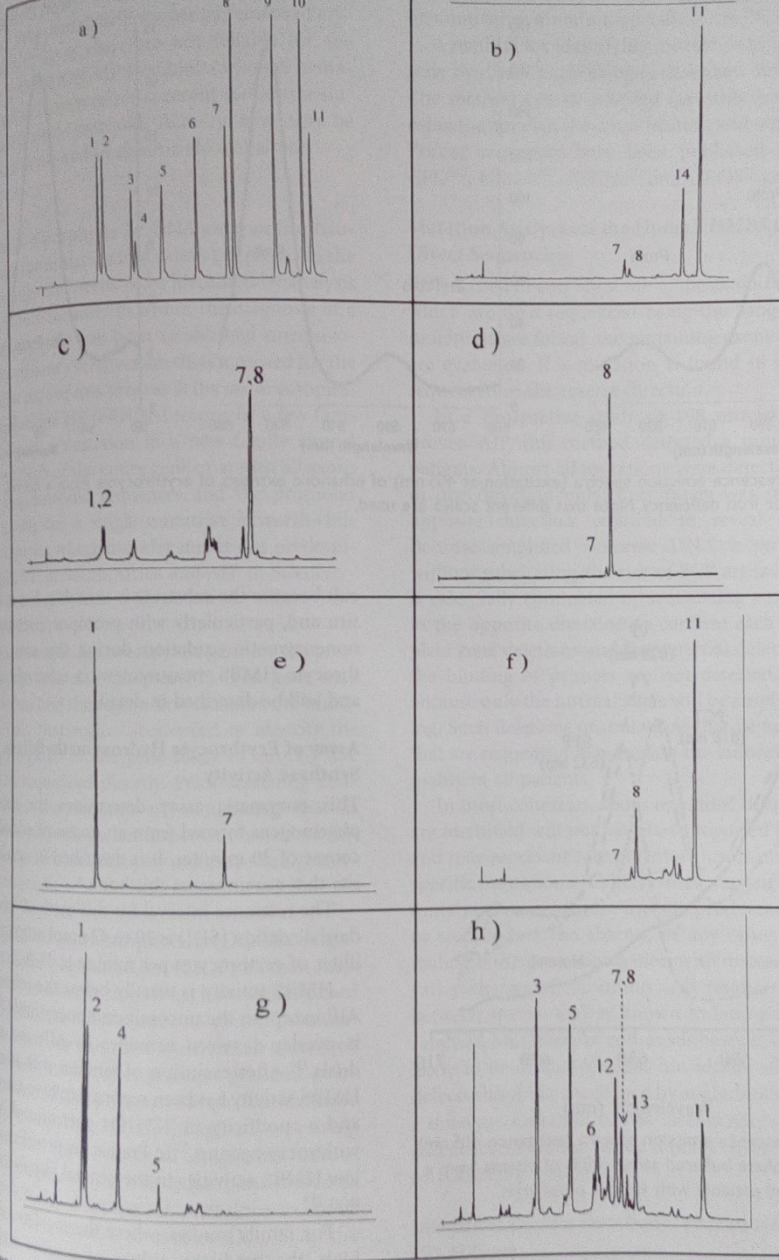
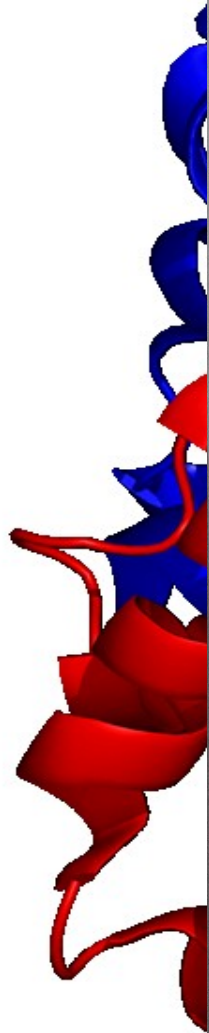
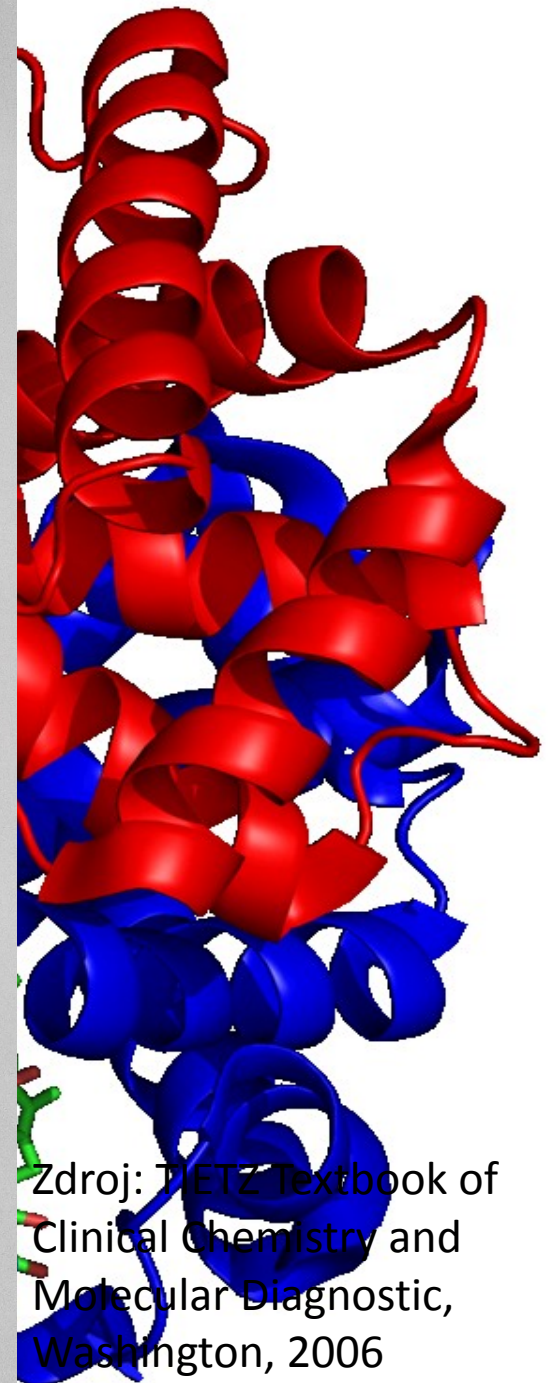


Figure 21-4 Representative HPLC chromatograms for (a) working standard; b, normal feces; c, normal urine; d, feces—hereditary erythropoietic porphyria; e, urine—congenital erythropoietic porphyria; f, feces—variegata porphyria; g, urine—porphyria cutanea tarda; h, urine—porphyria cutanea tarda chromatographic conditions as described in the appendix on the Evolve site that accompanies this text. Peaks are: 1, uroporphyrin-I; 2, uroporphyrin-III; 3, heptacarboxylate porphyrin-I; 4, heptacarboxylate porphyrin-III; 5, coproporphyrin-I; 6, pentacarboxylate porphyrin; 7, coproporphyrin-I; 8, coproporphyrin-III; 9, deuteroporphyrin-IX; 10, protoporphyrin-IX; 11, protoporphyrin-IX; 12, hydroxylisocoporphyrin; 13, isocoporphyrin; 14, pemtoporphyrin-IX.



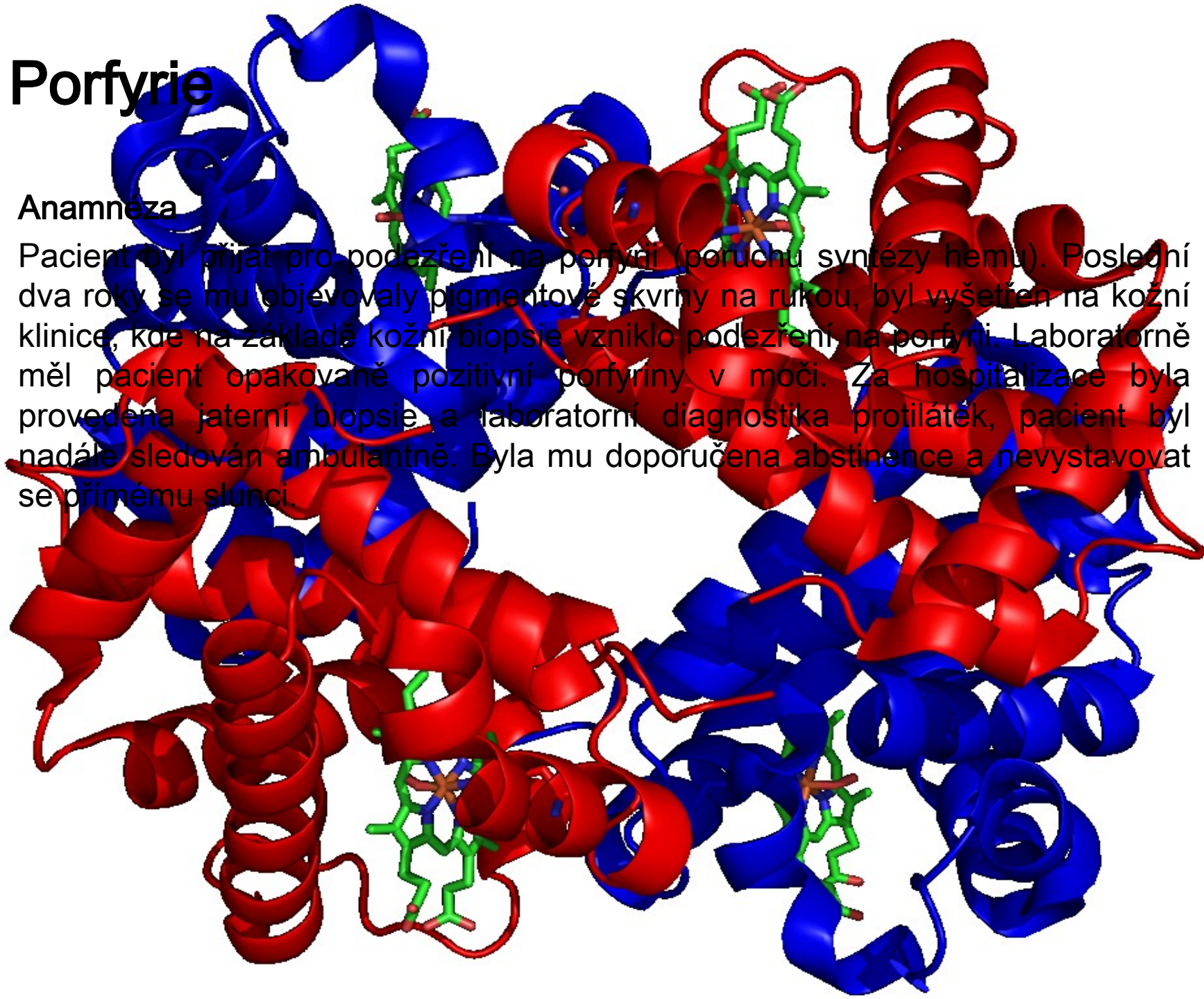
Zdroj: TETZ Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostic, Washington, 2006



# Porfyrie

## Anamnéza

Pacient byl přijat pro podezření na porfyrii (poruchu syntézy hemu). Poslední dva roky se mu objevovaly pigmentové skvrny na rukou, byl vyšetřen na kožní klinice, kde na základě kožní biopsie vzniklo podezření na porfyrii. Laboratorně měl pacient opakovaně pozitivní porfyriny v moči. Za hospitalizace byla provedena jaterní biopsie a laboratorní diagnostika protilátek, pacient byl nadále sledován ambulantně. Byla mu doporučena abstinence a nevystavovat se přímému slunci.



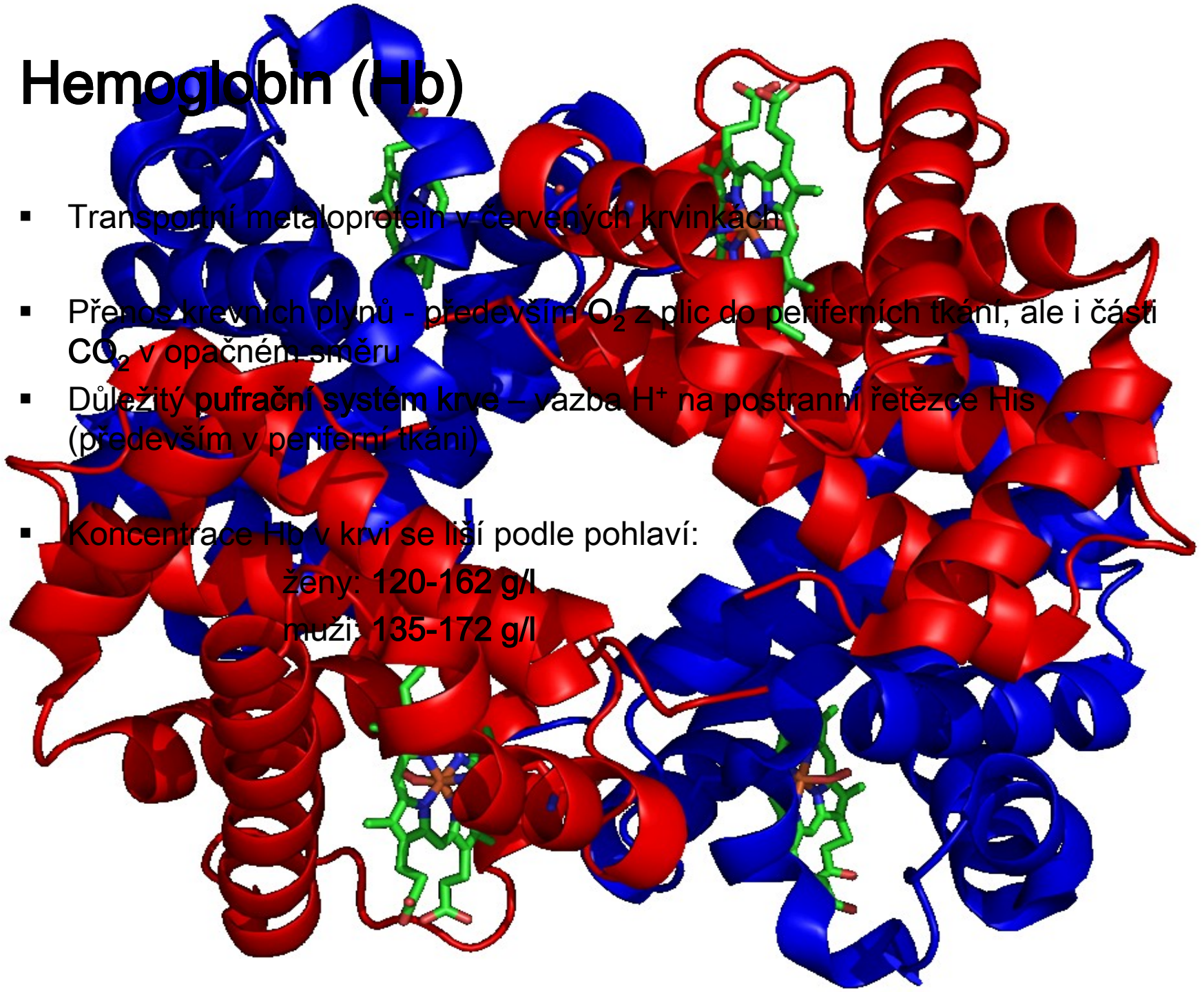
# Porfyrie

Test	Rok/Měsíc					Referenční interval	<input type="radio"/> SI <input type="radio"/> KJ
	1/1	1/2	1/3	3/1	5/1		
<b>Sérum</b>							
Urea	5,0	5,0	5,9	5,8	5,5	(1,7-8,3 mmol/l)	SI
Krea	98	83	101	80	82	(59-104 µmol/l)	SI
BiIT	14,6	9,4	6,8	10,4	9,7	(2,0-21,0 µmol/l)	SI
ALT	1,58	1,26	1,64	0,55	0,81	(0,17-0,85 µkat/l)	SI
AST	0,78	0,66	0,87	0,50	0,53	(0,17-0,85 µkat/l)	SI
GGT	1,14	0,68	0,90	0,27	0,51	(0,13-1,02 µkat/l)	SI
ALP	0,80	0,83	1,11	0,65	0,81	(0,67-2,15 µkat/l)	SI
<b>Moč</b>							
dU-Koproporfyryn	0,230	0,290	0,105	0,108	0,200	(0-0,280 µmol/24h)	SI
dU-Uroporfyryn	4,230	6,860	1,770	0,016	0,030	(0-0,050 µmol/24h)	SI
dU-Pentaporfyryn	0,120	0,150	0,057			(0-0,005 µmol/24h)	SI
dU-Hexaporfyryn	0,070	0,090	0,058			(0-0,006 µmol/24h)	SI
dU-Heptaporfyryn	0,700	1,060	0,562			(0-0,014 µmol/24h)	SI
U-Porfobilinogen			26,670			(0,04-36,00 µmol/l)	SI



# Hemoglobin (Hb)

- Transportní metaloprotein v červených krvinkách
- Přenos krevních plynů - především  $O_2$  z plic do periferních tkání, ale i části  $CO_2$  v opačném směru
- Důležitý pufrací systém krve – vazba  $H^+$  na postranní řetězce His (především v periferní tkáni)
- Koncentrace Hb v krvi se liší podle pohlaví:
  - ženy: 120-162 g/l
  - muži: 135-172 g/l





# Hemoglobin (Hb)

- Tetramer – podjednotky spojeny H<sub>2</sub>O
- Každá podjednotka složena z protinu (polypeptid) – hemu s centrálním kationtem Fe (vázanými vazbami)
- několik typů molekul Hb – rozlišuje se podle velikosti a  $\zeta$ :

## Adultní Hb:

- *Hb A1 (2 $\alpha$ 2 $\beta$ )*: majoritní forma

- *Hb A2 (2 $\alpha$ 2 $\delta$ )*: minoritní forma Hb u

celkového HbA

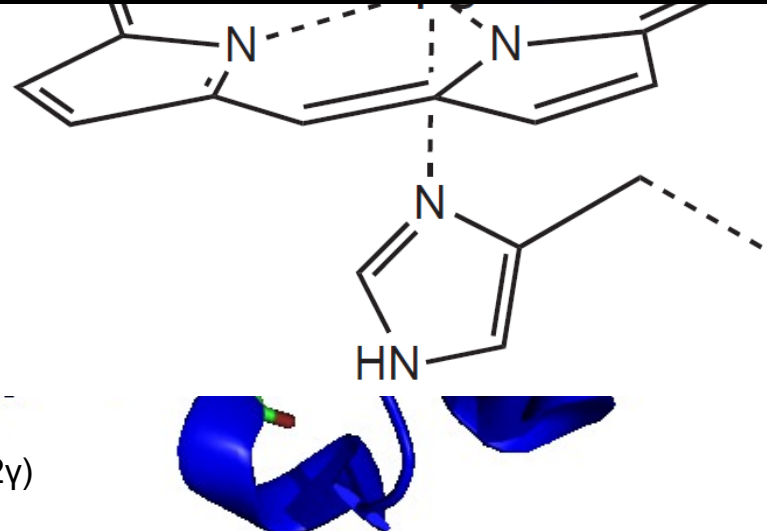
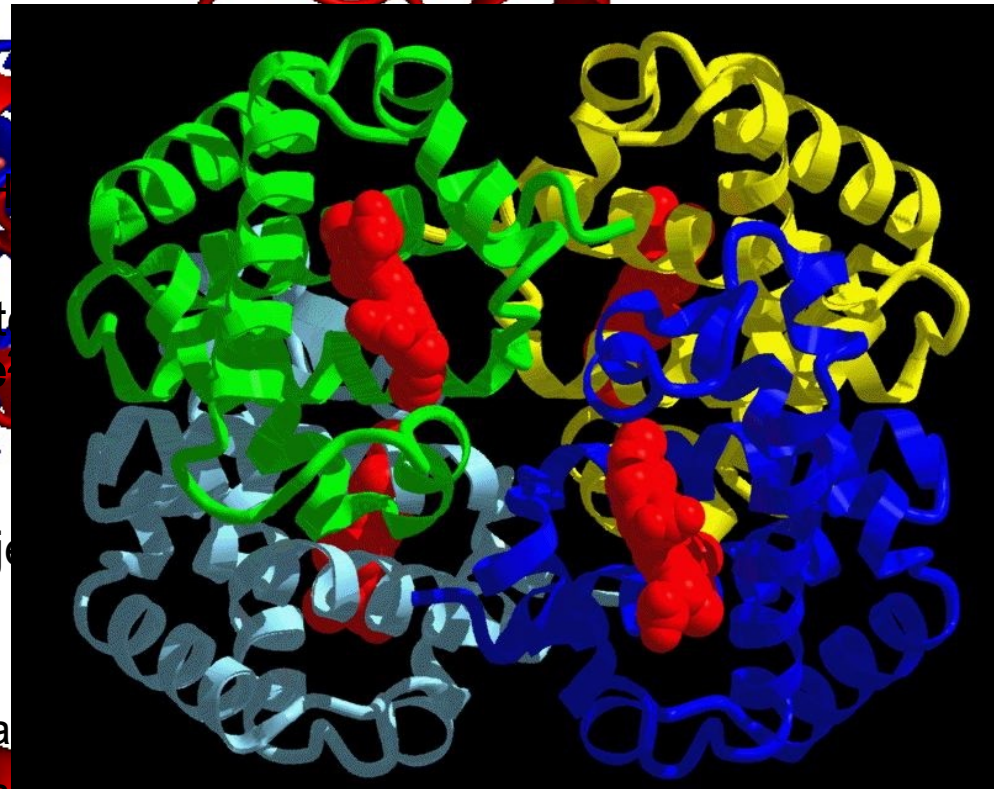
## Fetální Hb:

- *Hb F (2 $\alpha$ 2 $\gamma$ )*: tvořen u plodu, po narození nahrazován Hb A; u novorozenců až 70% celkové Hb

## Embryonální Hb

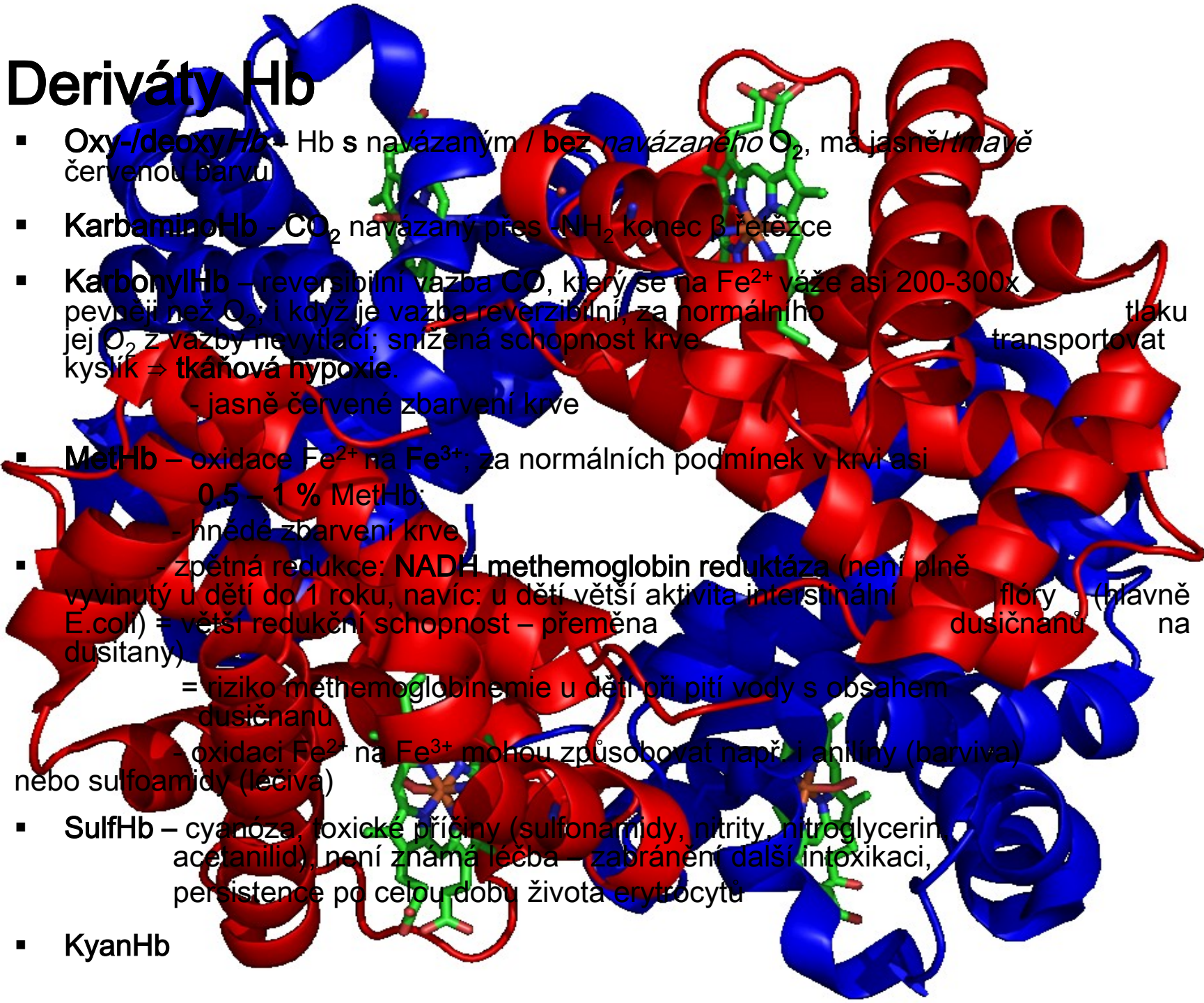
- tvořen u embryí buňkami krevních ostrůvků v období vývoje, později je nahrazen Hb F

- Gower I (2 $\zeta$ 2 $\epsilon$ ), Gower II (2 $\alpha$ 2 $\epsilon$ ), Portland (2 $\zeta$ 2 $\gamma$ )





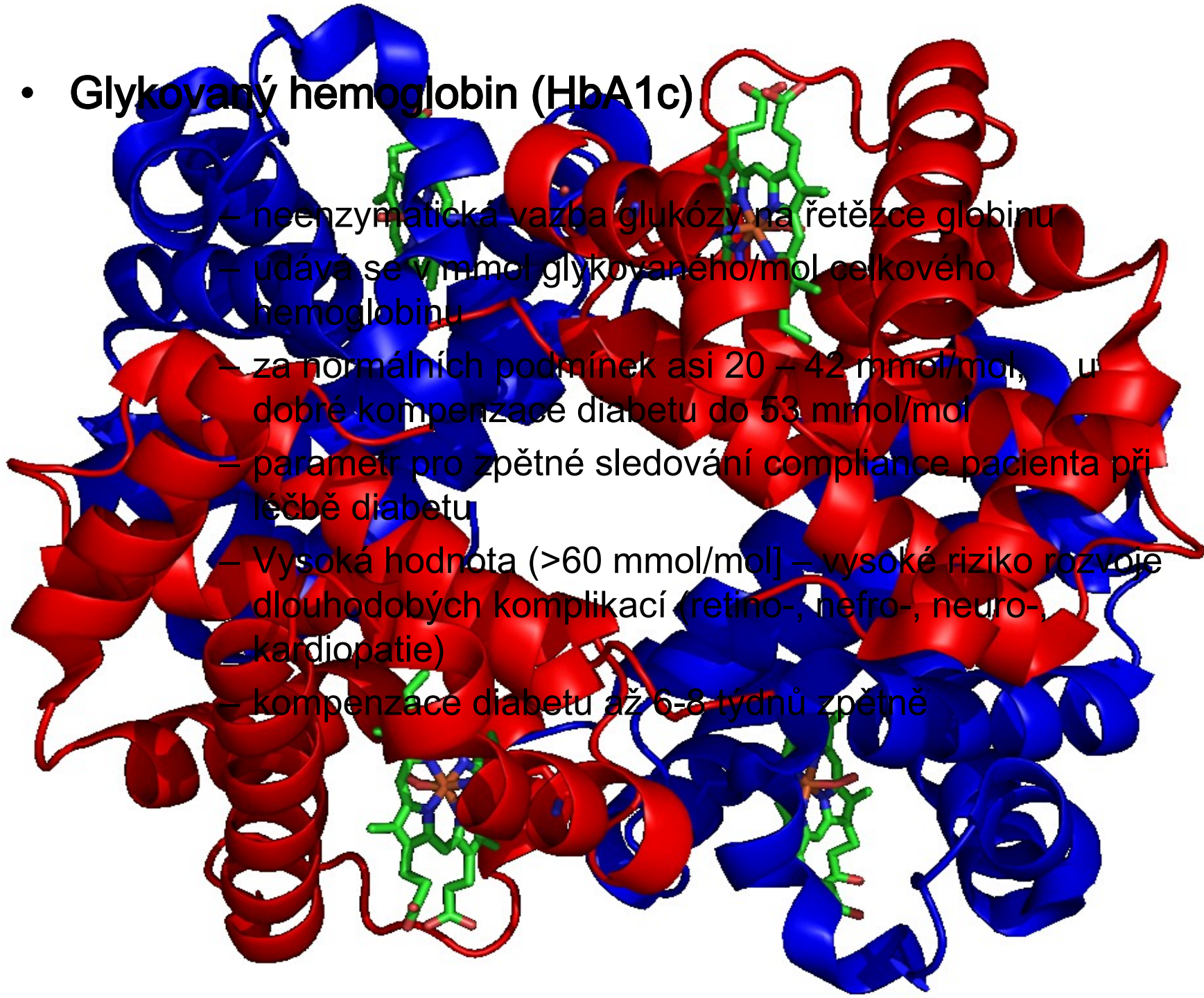
# Deriváty Hb

- **Oxy-/deoxyHb** – Hb s navázaným / bez navázaného  $O_2$ , má jasně/tmavě červenou barvu
  - **KarbaminoHb** –  $CO_2$  navázaný přes  $-NH_2$  konec  $\beta$  řetězce
  - **KarbonylHb** – reversibilní vazba CO, který se na  $Fe^{2+}$  váže asi 200-300x pevněji než  $O_2$ ; i když je vazba reverzibilní, za normálního tlaku jej  $O_2$  z vazby nevytláčí; snížená schopnost krve transportovat kyslík  $\Rightarrow$  tkáňová hypoxie.
    - jasně červené zbarvení krve
  - **MetHb** – oxidace  $Fe^{2+}$  na  $Fe^{3+}$ ; za normálních podmínek v krvi asi 0,5 – 1 % MetHb;
    - hnědé zbarvení krve
  - - zpětná redukce: NADH methemoglobin reduktáza (není plně vyvinutý u dětí do 1 roku, navíc: u dětí větší aktivita interstiniální flóry (hlavně E.coli)  $\Rightarrow$  větší redukční schopnost – přeměna dusičnanů na dusitany)
    - = riziko methemoglobinemie u dětí při pití vody s obsahem dusičnanů
  - - oxidaci  $Fe^{2+}$  na  $Fe^{3+}$  mohou způsobovat např. i anilíny (barviva) nebo sulfoamidy (léčiva)
  - **SulfHb** – cyanóza, toxické příčiny (sulfonamidy, nitrity, nitroglycerin, acetanilid), není známa léčba – zabránění další intoxikaci, persistence po celou dobu života erytrocytu
  - **KyanHb**
- 



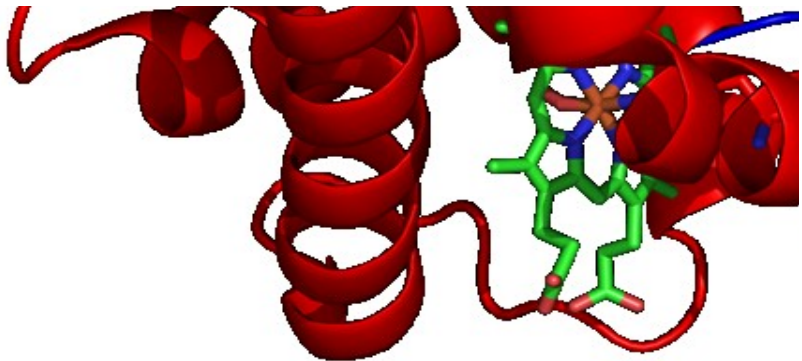
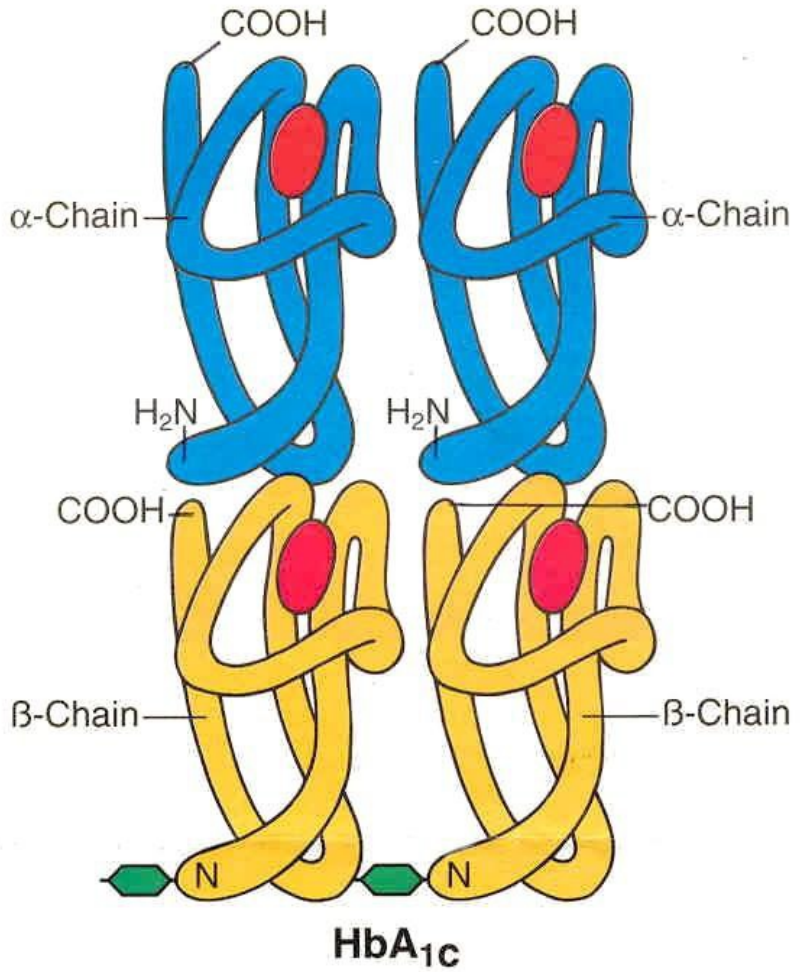
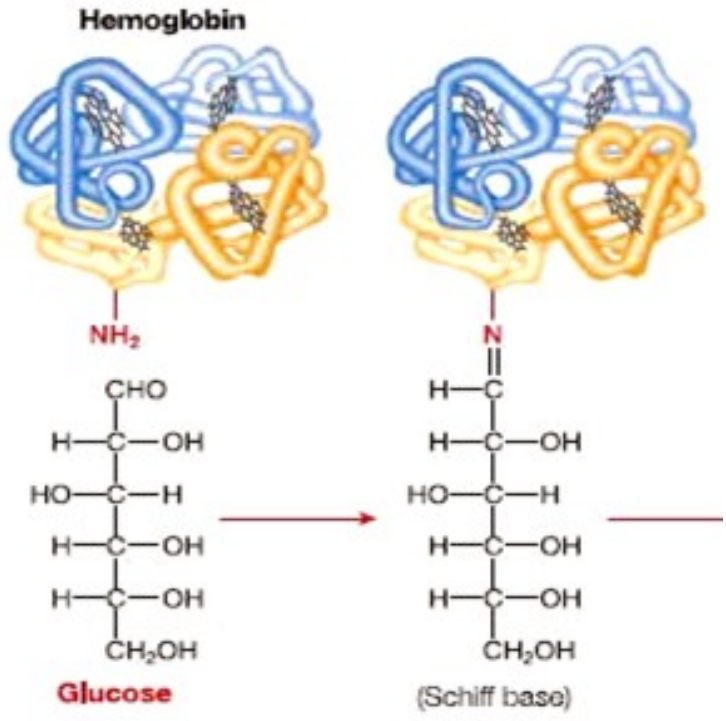
- **Glykovaný hemoglobin (HbA1c)**

- neenzymatická vazba glukózy na řetězce globinu
- udává se v mmol glykovaného/mol celkového hemoglobinu
- za normálních podmínek asi 20 – 42 mmol/mol, u dobré kompenzace diabetu do 53 mmol/mol
- parametr pro zpětné sledování compliance pacienta při léčbě diabetu
- Vysoká hodnota (>60 mmol/mol] – vysoké riziko rozvoje dlouhodobých komplikací (retino-, nefro-, neuro-, kardiopatie)
- kompenzace diabetu až 6-8 týdnů zpětně



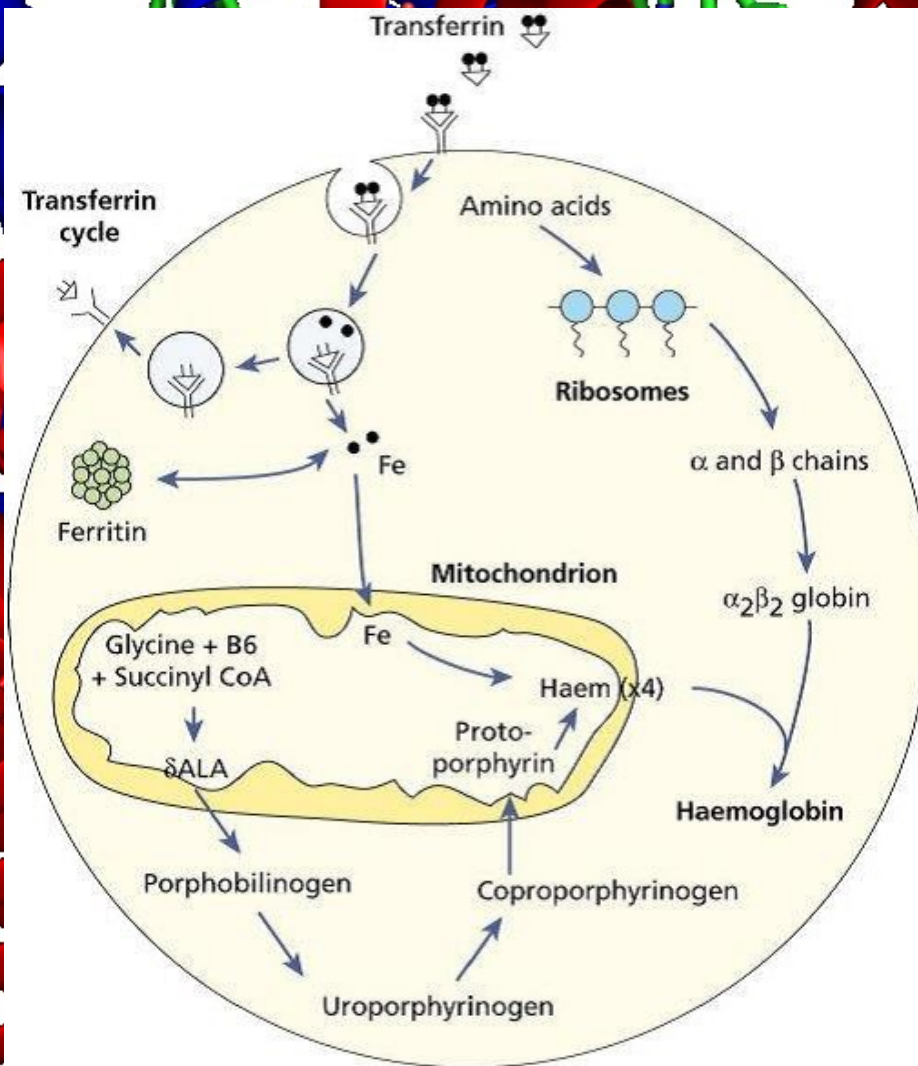


- Glykovaný hemoglobin (HbA1c)



# Syntéza Hb

- v kostní dřeni a erytroblastech (nikoliv v erythrocytech!)



From: *Essential Haematology*, 6th Edn. © A. V. Hoffbrand & P. A. H. Moss. Published 2011 by Blackwell Publishing Ltd.



# Poruchy tvorby Hb

- Poruchy syntézy hemu

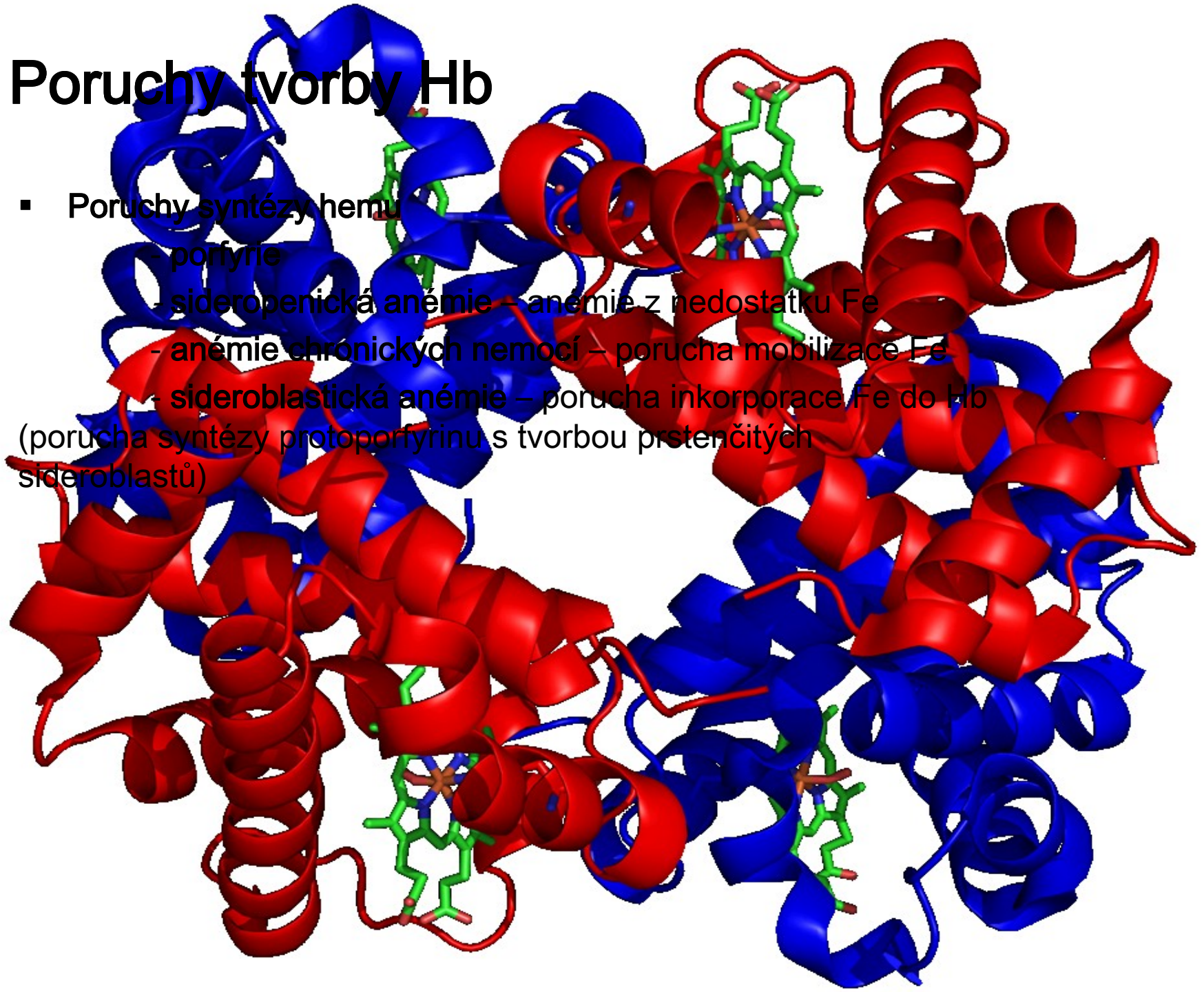
- porfýrie

- sideropenická anémie – anémie z nedostatku Fe

- anémie chronických nemocí – porucha mobilizace Fe

- sideroblastická anémie – porucha inkorporace Fe do Hb

(porucha syntézy protoporfyrinu s tvorbou prstenčitých sideroblastů)





# Poruchy tvorby Hb

- Poruchy syntézy globinu

- **talasémie** – geneticky podmíněná snížená nebo chybějící syntéza některého z globinových řetězců

- Beta-talasémie* – omezená produkce  $\beta$ -řetězců, kompenzace syntézou HbA<sub>2</sub>, HbF, (fragilnější Ery, porucha zabudovávání Fe)

- **hemoglobinopatie** – vrozené defekty genu tvořícího řetězce globinu

- záměna aminokyselin a následná syntéza patologicky změněné molekuly Hb (varianty hemoglobinu); nejznámější:

- Hemoglobinopatie S* (Srpkovitá anémie, Glutamin  $\beta 6 \rightarrow$  Val)

- > hemolytické projevy, zkrácené přežívání drepanocytů, ztráta negativního náboje Hb

- vyšší odolnost vůči malárii

- **Analýza globinových řetězců**

- disociace globinových řetězců a hemu

- následná separace – elektroforeticky, HPLC, isoelektrická fokuzace

- možná i analýza pomocí MS



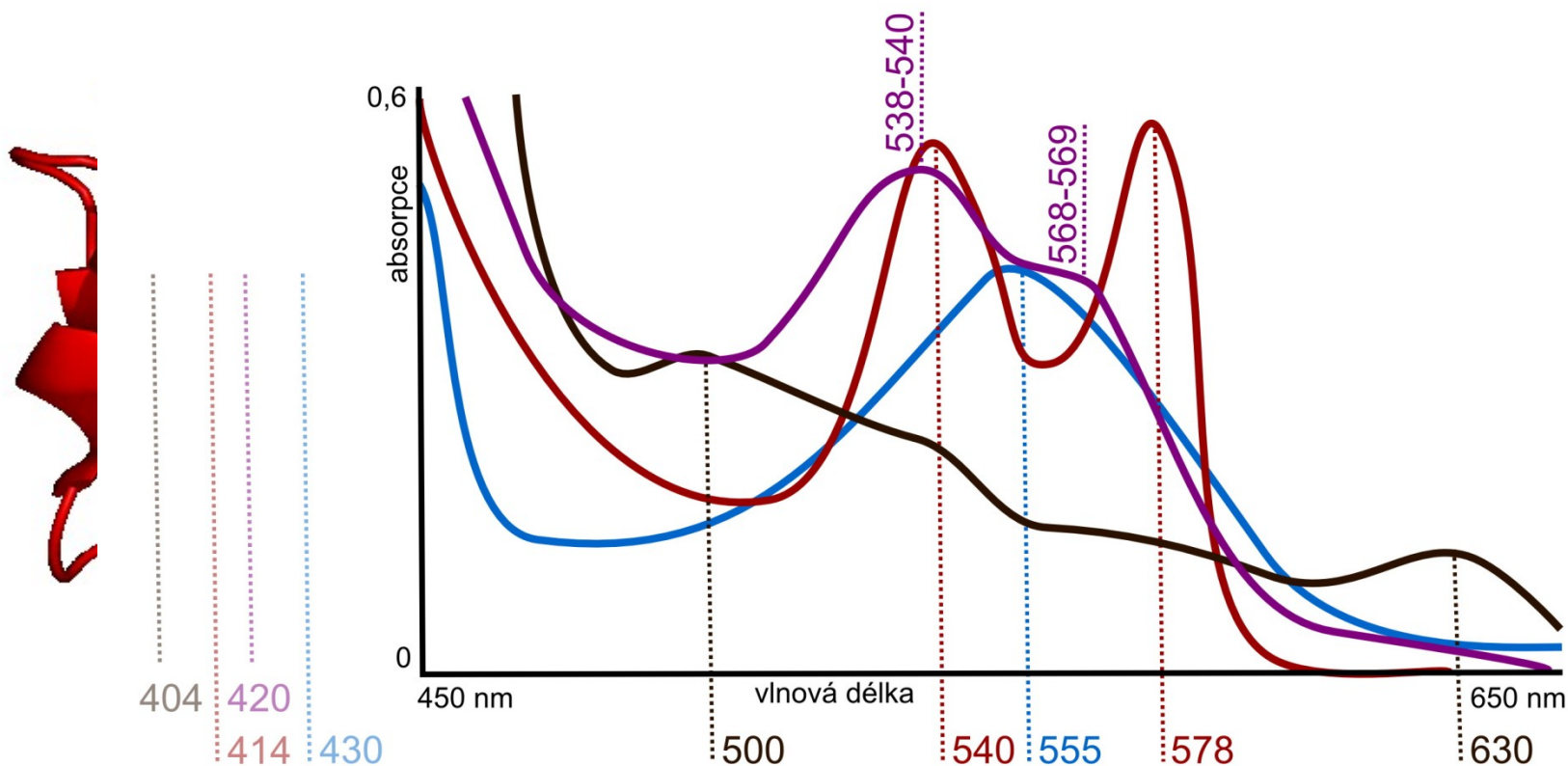
# Stanovení Hb a jeho derivátů

- **Spektrofotometrické měření** – tHb i jeho deriváty mají charakteristická absorpční spektra ve viditelné oblasti záření

⇒ typická výrazná absorpční maxima v oblasti 400–430 nm

(Soretův pás), další absorpční vrcholy jsou podstatně nižší

oxyhemoglobin deoxyhemoglobin (redukováný Hb) methemoglobin karbonylhemoglobin



# Stanovení Hb a jeho derivátů

## ▪ Stanovení Hb v plné krvi

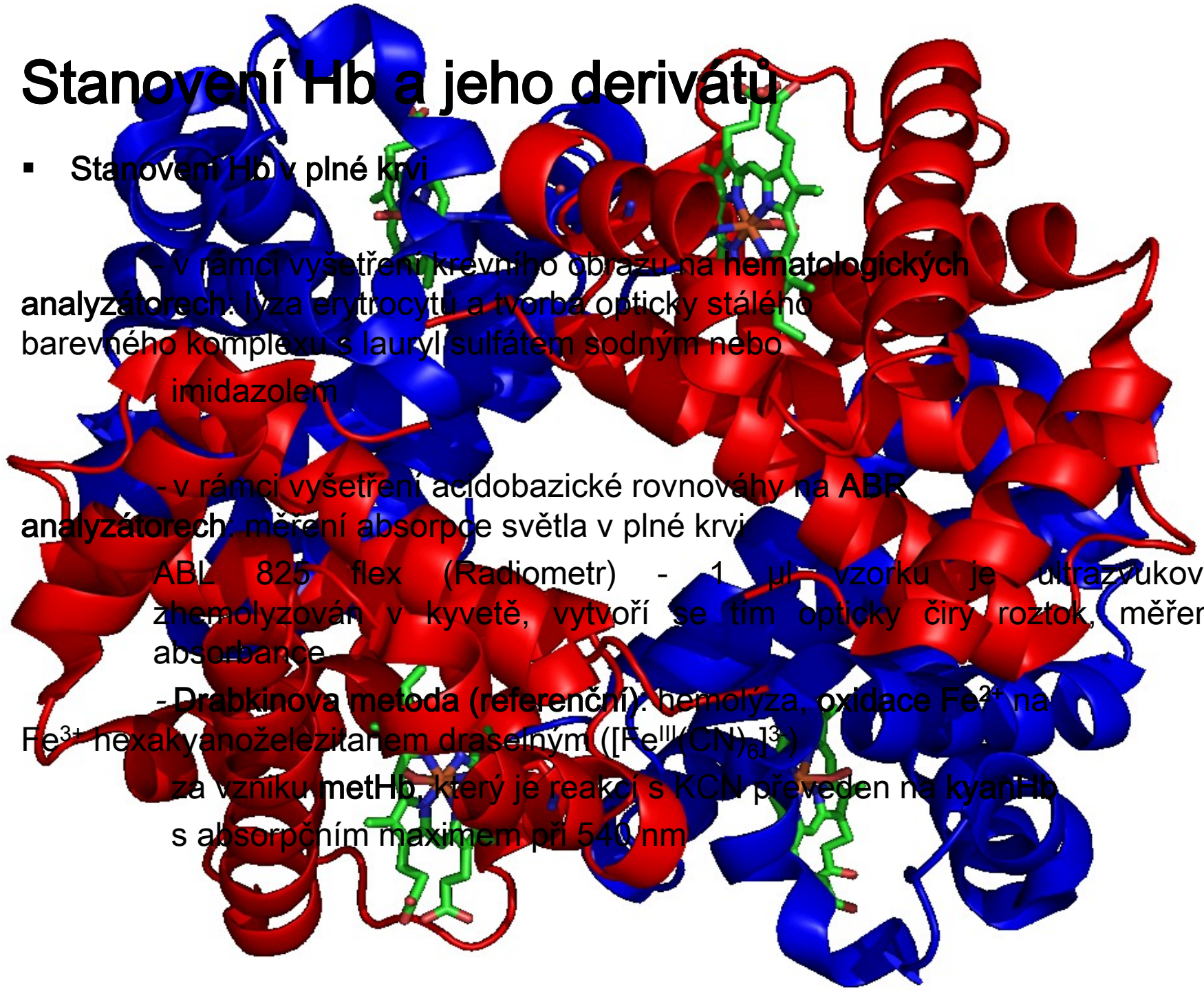
- v rámci vyšetření krevního obrazu na hematologických analyzátoch: lyza erytrocytů a tvorba opticky stálého barevného komplexu s lauryl sulfátem sodným nebo imidazolem

- v rámci vyšetření acidobazické rovnováhy na ABR analyzátoch: měření absorpce světla v plné krvi

ABL 825 flex (Radiometr) - 1  $\mu$ l vzorku je ultrazvukově zhemolyzován v kyvetě, vytvoří se tím opticky čirý roztok, měření absorpance

- Drabkinova metoda (referenční): hemolyza, oxidace  $Fe^{2+}$  na  $Fe^{3+}$  hexakynoželezitanem draselným ( $[Fe^{II}(CN)_6]^{3-}$ )

za vzniku metHb, který je reakcí s KCN převeden na kyanHb s absorpčním maximem při 540 nm







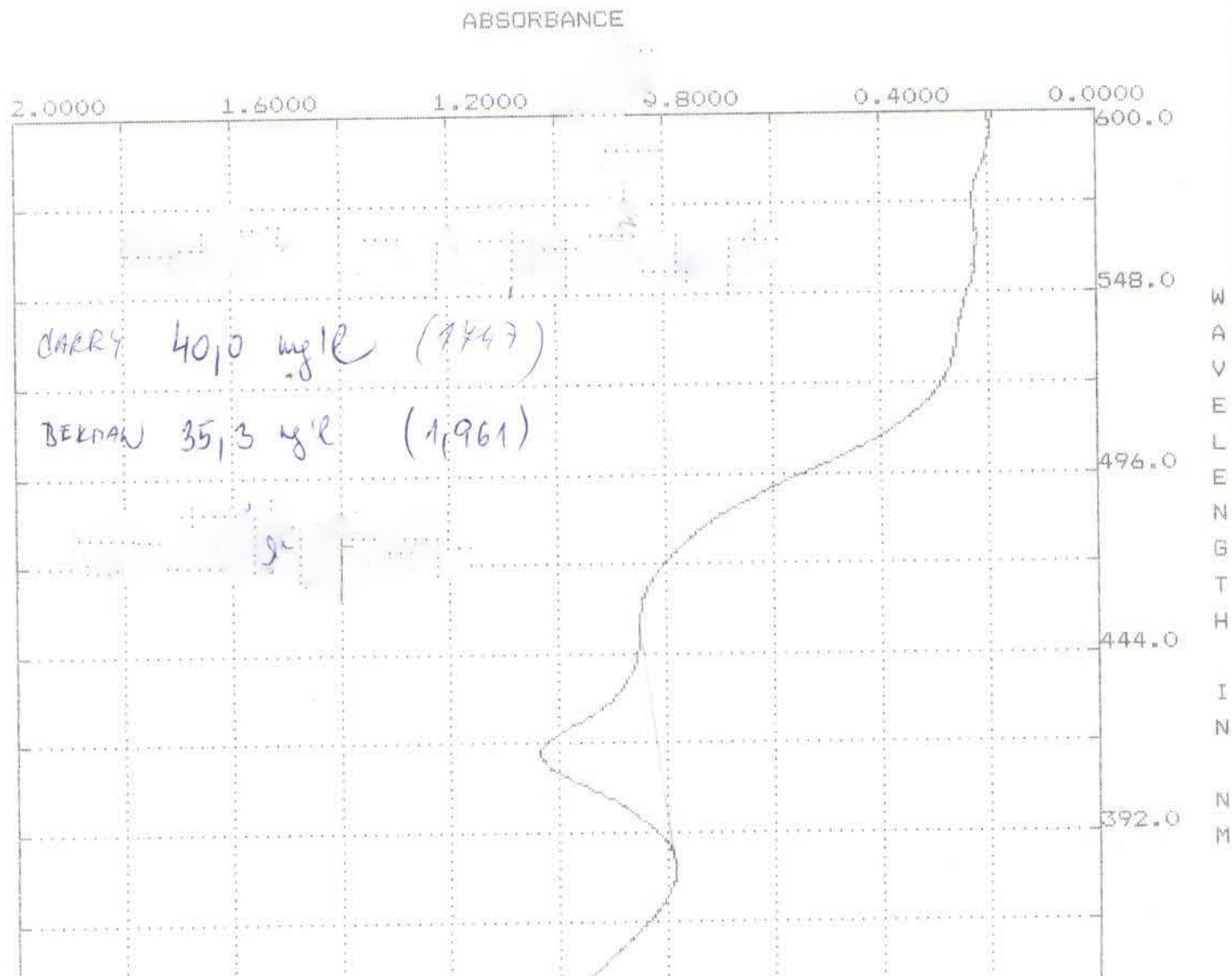
# Star

- Sta

využívá  
měření  
600, 66

absorp

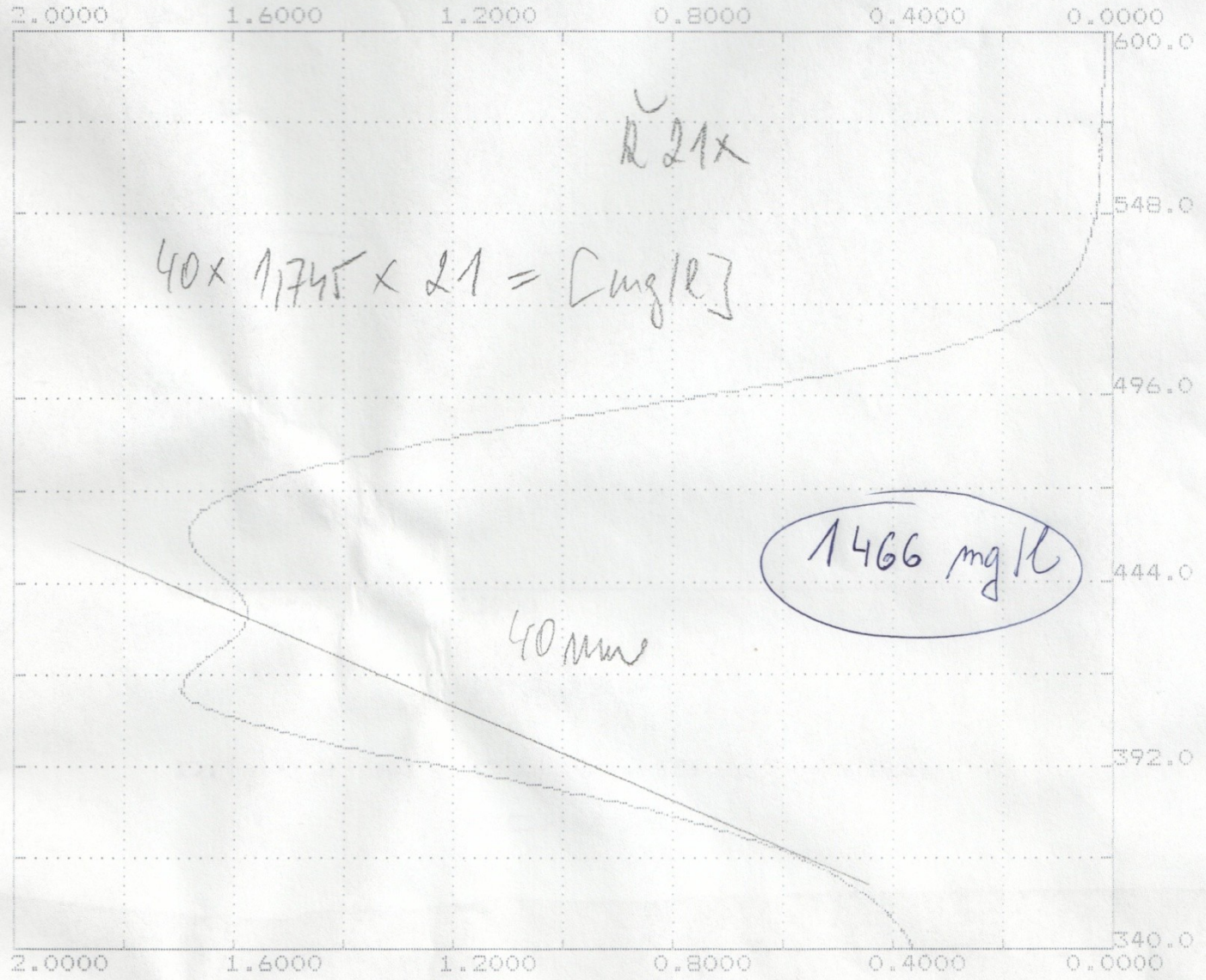
## BECKMAN DU-65 SPECTROPHOTOMETER





Vo

S  
B  
B  
S  
S  
S  
fH



Scan Speed: 500 nm/min

# Stanovení Hb a jeho derivátů

- Stanovení Hb

- HF

- Stanovení

- im

- kolorektálního

- detekce po

- degradován t

- cu

kolonoskopická  
nález

- Stanovení

$\mu\text{g Hb/g}$

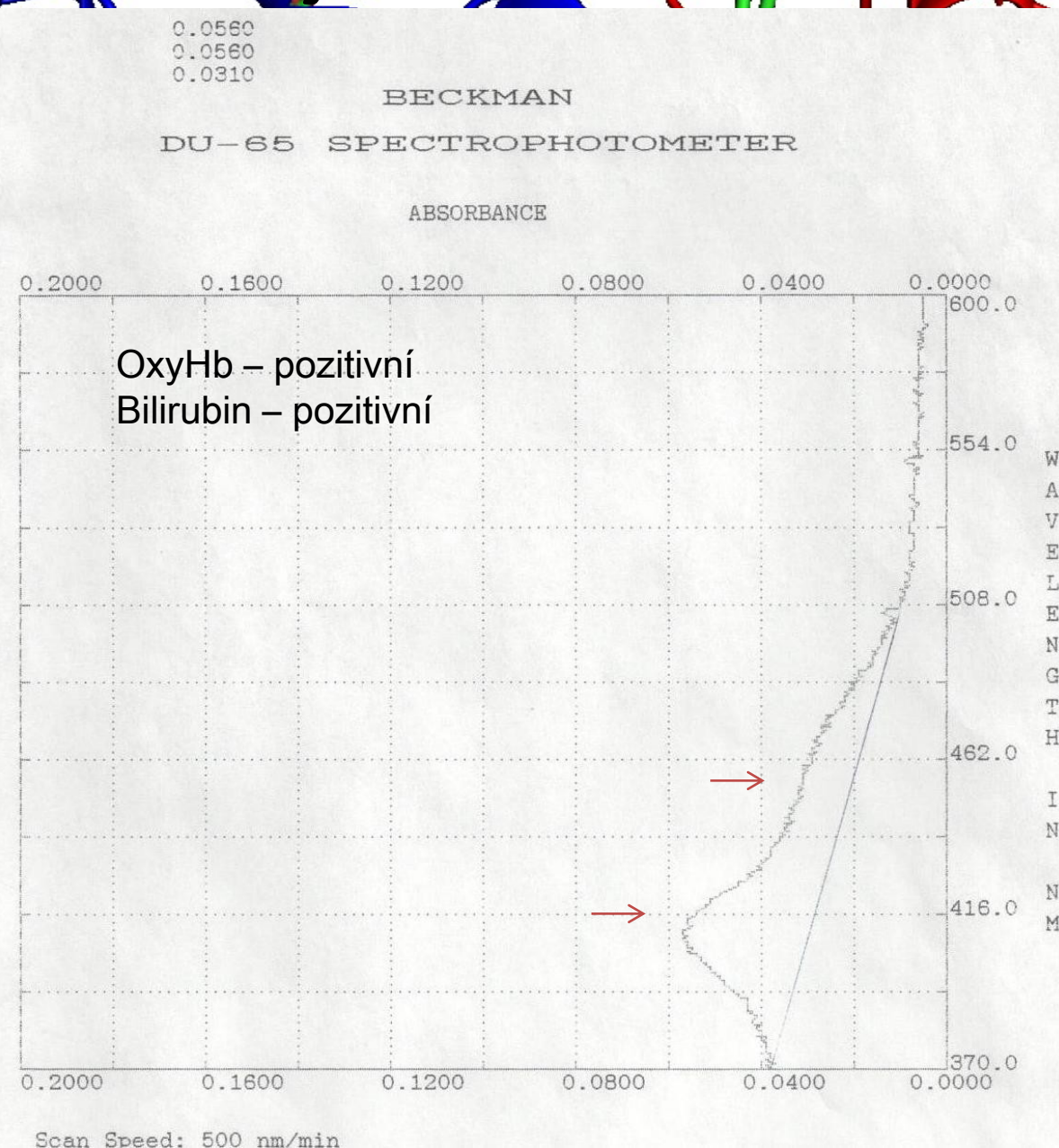
- po

- analýzy moče

- Stanovení

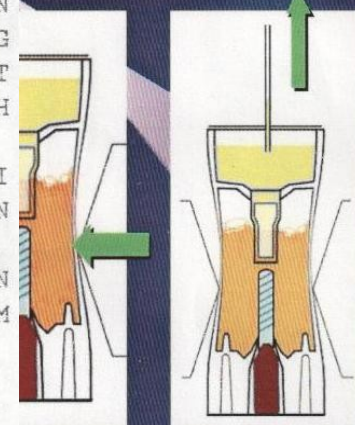
- dia

- sp



SENSOR  $\mu$

NÁSTRÍK 25  $\mu$ l  
PRO ANALÝZU



EXTRAKTU  
FILTR DO  
ACÍ JAMKY

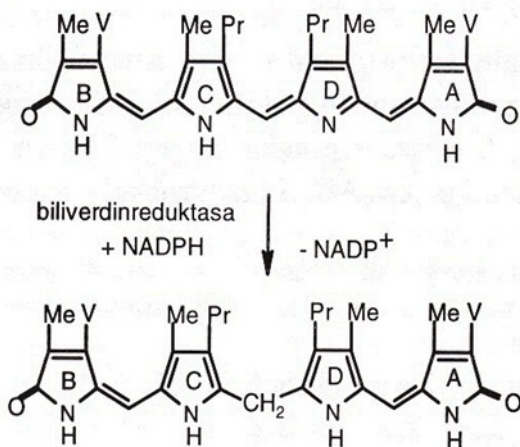
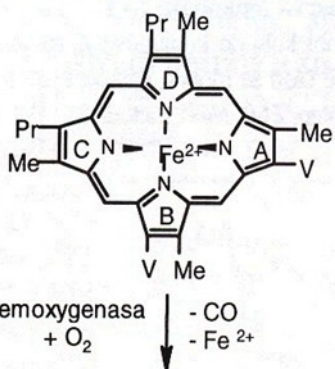
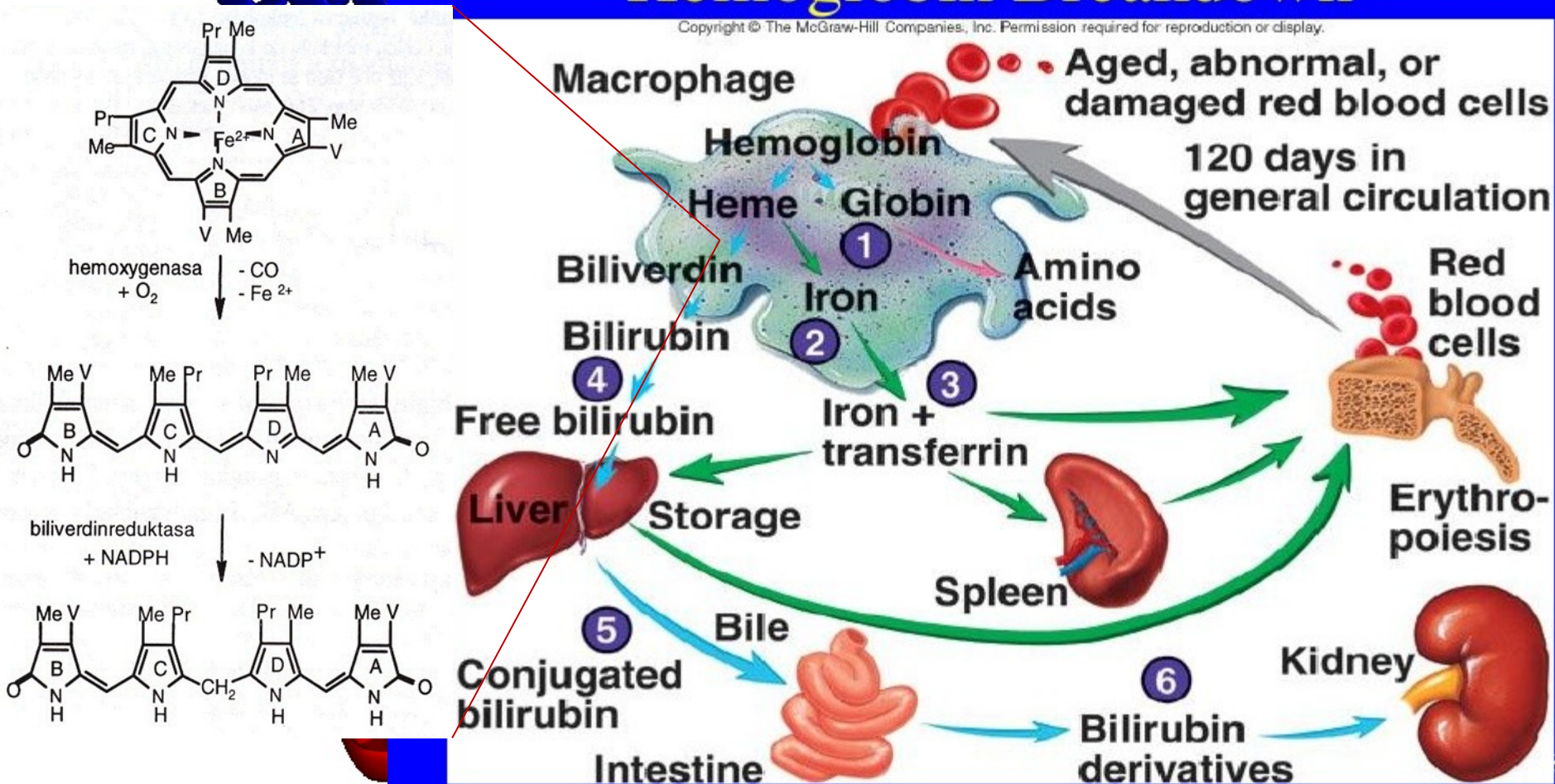


# Odbourávání Hb

- V retikulo-endoteliálním systému (RES)  
 → slezina, kostní dřeň, játra, podkoží

## Hemoglobin Breakdown

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.





# Bilirubin

- **Přímý**

= konjugovaný bilirubin, který po přidání směsi diazočinidel k séru dává typické zbarvení

- navázaný na glukuronát (mono- nebo di-glukuronidy)

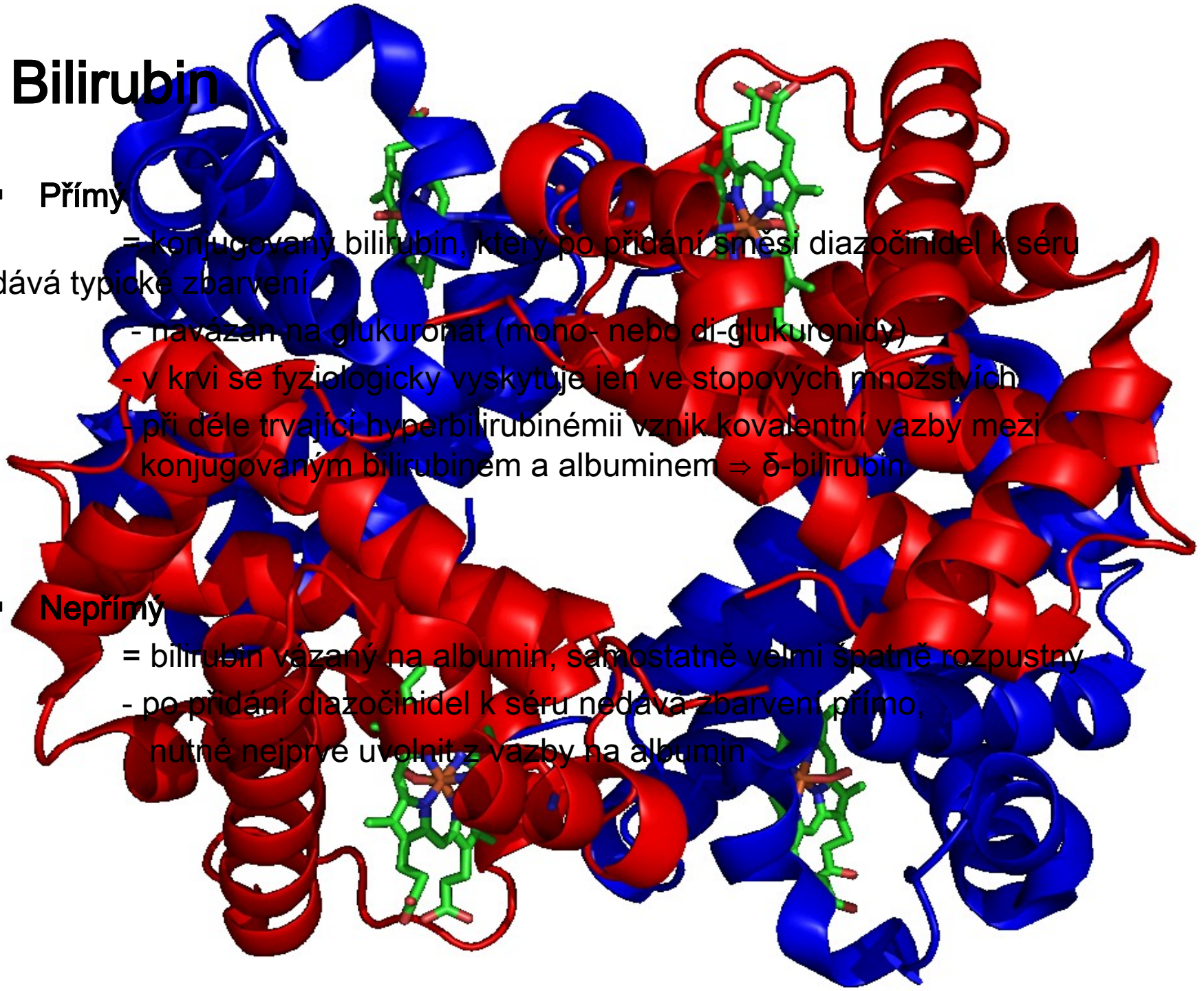
- v krvi se fyziologicky vyskytuje jen ve stopových množstvích

- při déle trvající hyperbilirubinémii vznik kovalentní vazby mezi konjugovaným bilirubinem a albuminem  $\Rightarrow$   $\delta$ -bilirubin

- **Nepřímý**

= bilirubin vázaný na albumin, samostatně velmi špatně rozpustný

- po přidání diazočinidel k séru nedává zbarvení přímo, nutně nejprve uvolnit z vazby na albumin





# Bilirubin

- Při zvýšené koncentraci v krvi, **hyperbilirubinémii**, dochází ke žlutému zbarvení kůže a sliznic – ikterus, žloutenka

- Rozdělení hyperbilirubinémii

- podle typu bilirubinu:

- nekonjugované - při nadměrné tvorbě bilirubinu, ale i při nezvýšené produkci bilirubinu, pokud játra nemají dostatečnou vychytávací nebo konjugační schopnost

- konjugované – obstrukce žlučových cest (lithiáza, nádor...)

- smíšené - poškození hepatocytů s poruchou vychytávání a konjugače bilirubinu a porucha vylučování konjugovaného bilirubinu do žluče

- podle vztahu vyvolávající příčiny k játrům:

- prehepatální – nadměrný vznik bilirubinu při zdravých játrech; nejčastěji rozpad erytrocytů (ikterus hemolytický)

- hepatální – při poškození jaterních buněk (ikterus hepatální)

- posthepatální – nejčastěji při obstrukci žlučových cest (ikterus obstrukční)

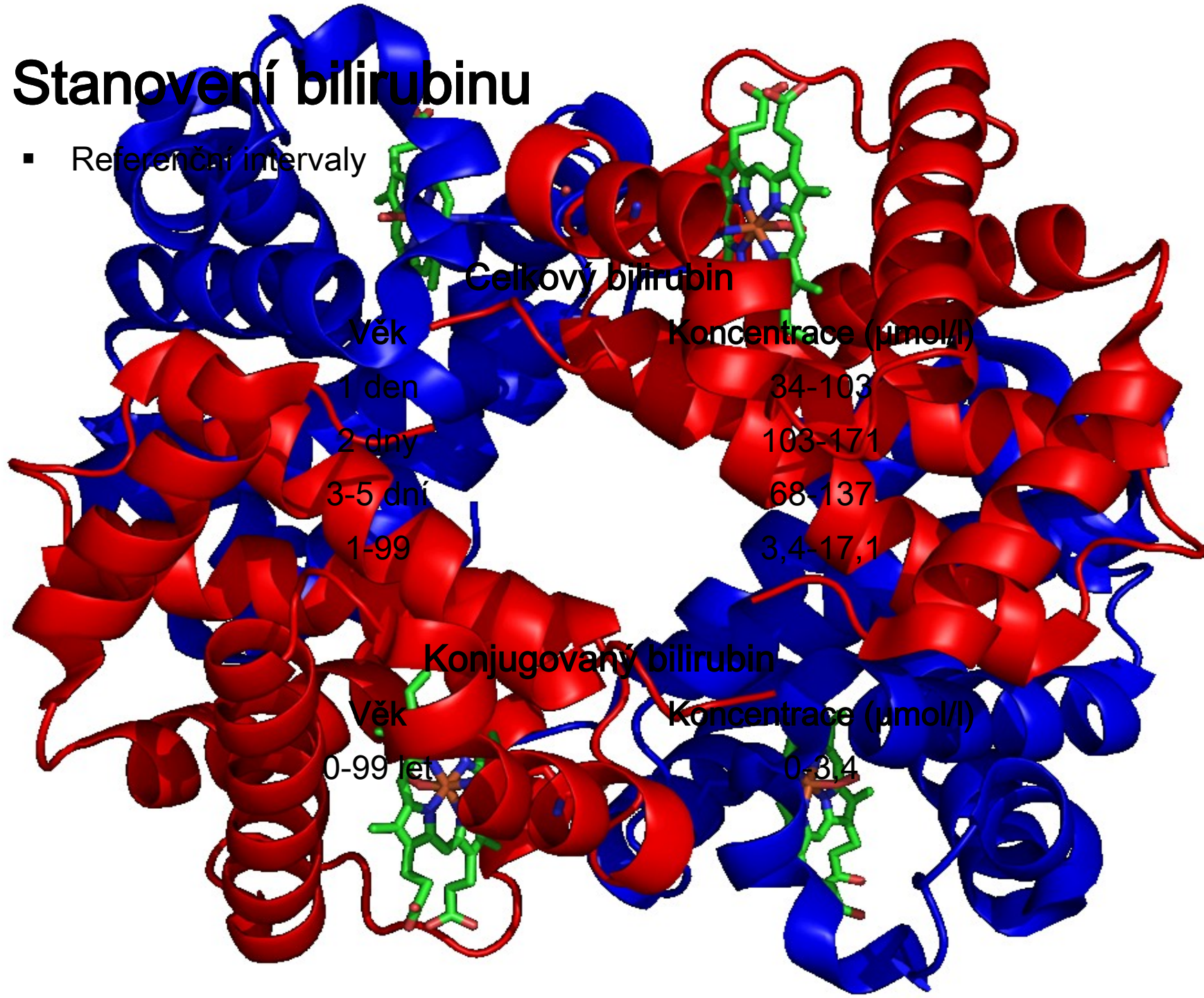






# Stanovení bilirubinu

- Referenční intervaly



# Stanovení bilirubinu

## ▪ Spektrofotometrické stanovení

většina metod fotometrického stanovení bilirubinu vychází z diazotačních reakcí.

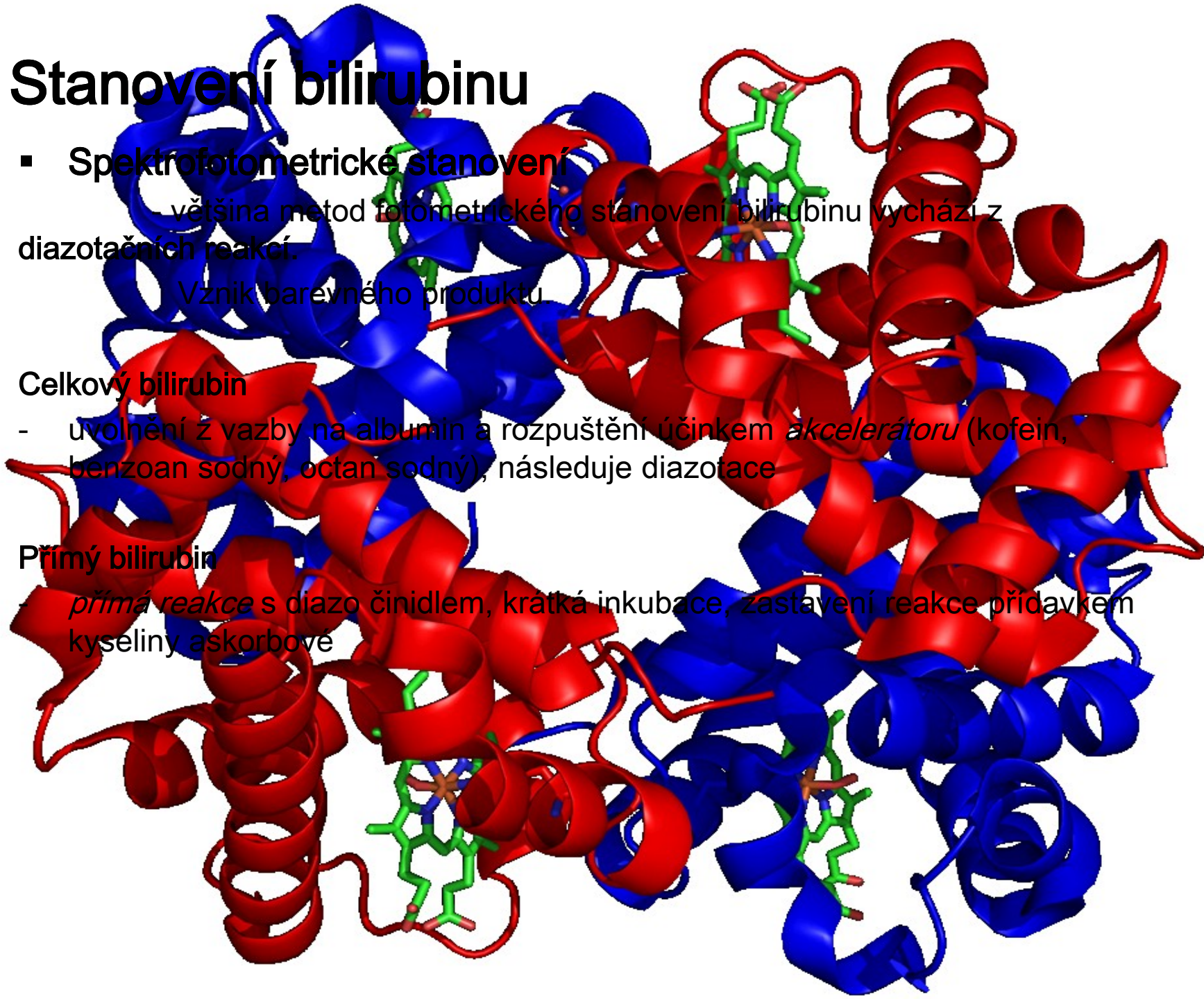
Vznik barevného produktu

## Celkový bilirubin

- uvolnění z vazby na albumin a rozpuštění účinkem *akcelerátoru* (kofein, benzoan sodný, octan sodný), následuje diazoface

## Přímý bilirubin

- *přímá reakce* s diazo činidlem, krátká inkubace, zastavení reakce přidáním kyseliny askorbové





# Stanovení bilirubinu

- Rutinní metody: Jendrossik – Gróf, fotometrické metody s DCA a DPD

- Jendrossik-Gróf: - reakce s diazotovanou kys. sulfanilovou (čínidlo z kys. sulfanilové a dusitanu sodného)

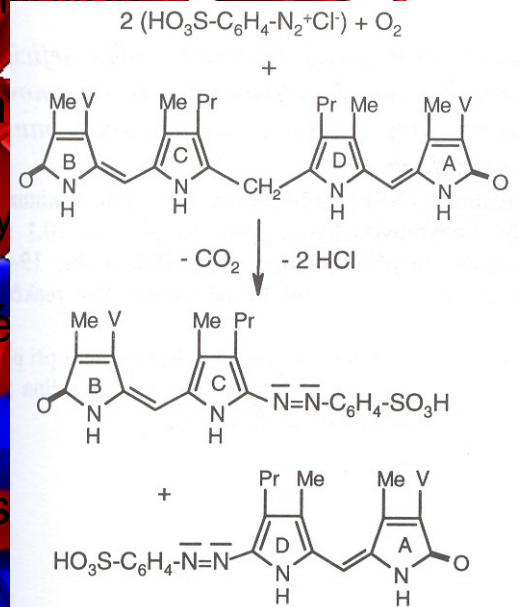
- při stanovení celkového bilirubinu předchází přidání kofeinu + benzoátu

- vznik azobilirubinu - při slabě kytrném pH červený (absorbční maximum 440 nm, vadí hemolýza), v silně kyselém prostředí zelenomodrý

- **DPD:** - Postupně v praxi nahrazovalo met. Jendrossik-Gróf

- dichlorofenyldiazonium tetrafluoroborát  
- hemolýza ruší až od vysokých hodnot hemoglobinu  
- v současnosti prakticky jediná používaná metoda

- Referenční metoda: Doumas – Perry (optimalizovaná a specifikovaná metoda Jendrossik-Gróf)



Kopulace bilirubinu s diazotovanou kyselinou sulfanilovou - tvorba azobilirubinu

# Stanovení bilirubinu

- **Přímá spektrofotometrie u novorozenců**
  - přímé bichromatické stanovení při 454 a 540 nm (bilirubinometry)
  - nelze použít u starších dětí a dospělých (interference karotenu a jiných pigmentů)
- **Enzymatické stanovení**
  - využití enzymu bilirubinoxidázy, která katalyzuje oxidaci bilirubinu na zelený biliverdin
  - sleduje se pokles absorbance při 405 – 460 nm po dobu 5 min

